



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS
DE ORIGEN CÁRNICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LA
ENTEROCINA P DE *Enterococcus faecium* P13 Y DE LA
ENTEROCINA B DE *Enterococcus faecium* T136**

MARÍA DEL PILAR CASAUS LARA

Madrid, marzo de 1998



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III

(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS
DE ORIGEN CÁRNICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LA
ENTEROCINA P DE *Enterococcus faecium* P13 Y DE LA
ENTEROCINA B DE *Enterococcus faecium* T136**

Memoria que, para optar al título de Doctor en Veterinaria
con mención honorífica de "Doctor Europeo", presenta
la Licenciada en Veterinaria

MARÍA DEL PILAR CASAUS LARA

Madrid, marzo de 1998



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

LUIS M. CINTAS IZARRA, DOCTOR EN CIENCIAS (SECCIÓN BIOLÓGICAS) E INVESTIGADOR POSTDOCTORAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, CATEDRÁTICO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID E INGOLF F. NES, CATEDRÁTICO DE BIOTECNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOTECNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AGRÍCOLA DE NORUEGA,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN CÁRNICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LA ENTEROCINA P DE *Enterococcus faecium* P13 Y DE LA ENTEROCINA B DE *Enterococcus faecium* T136", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. María del Pilar Casaus Lara, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en el Laboratorio de Tecnología Genética Microbiana del Departamento de Ciencias Biotecnológicas de la Universidad Agrícola de Noruega, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria con mención honorífica de "Doctor Europeo".

Madrid, 1 de marzo de 1998.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Pablo E. Hernández Cruza

Ingolf F. Nes

A mi padre, D. José Antonio Casaus Martín

A mi madre, Dña. María Luisa Lara Aznar

A mis hermanos, Cristina, Marisa, José, Belén y Elena

Al Dr. Luis M. Cintas Izarra

“Infinidad de veces he caído de rodillas ante la abrumadora convicción de que no se abría ante mí camino alguno. Mi propia sabiduría y la de todos los demás me parecía insuficiente para ese día”

Abraham Lincoln

“Sólo se encuentra la verdad con la lógica si antes se ha encontrado sin ella”

Gilbert Keith Chesterton

“A la larga siempre acierta el que se fía del genio”

Leopoldo Alas Clarín

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la colaboración científica de numerosos investigadores y al apoyo personal de familiares y amigos, por lo que quiero dejar constancia de mi más sincero y profundo agradecimiento a todos ellos.

Quiero expresar mi gratitud, de manera especial, al Dr. Luis M. Cintas Izarra, uno de los Directores de esta Tesis Doctoral y mi maestro desde sus comienzos, por su ejemplo profesional y su apoyo y dedicación constante en todo momento. Sus conocimientos científicos y su facilidad para transmitirlos, sus brillantes ideas, su capacidad de dirección, su enorme paciencia y su constante ayuda y ánimo han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A los Dres. D. Bernabé Sanz Pérez y D. Pablo E. Hernández Cruza por la posibilidad que me brindaron de incorporarme al área de Higiene, Inspección y Análisis de los Alimentos del Departamento de Nutrición y Bromatología III tras examinarme del examen de grado, así como por la confianza que depositaron en mí para la realización de este trabajo. Asimismo, quiero agradecer al Dr. D. Jose Antonio Ordoñez Pereda, actual Director de nuestro Departamento, su colaboración durante estos años.

A todos los demás miembros del Departamento que de una u otra manera han colaborado en la realización de este trabajo y, particularmente, a Fernanda Fernández Álvarez, por la sinceridad y comprensión que siempre me ha brindado. Al Dr. D. José Tormo Iguacel por sus valiosas enseñanzas acerca de la Microbiología de los Alimentos y a Aurora Blanco por su incondicional ayuda y guía por los difíciles senderos de la burocracia. Estoy muy agradecida a todos los becarios del Departamento, en especial al equipo LAB, por haber hecho mas agradables las largas y duras jornadas en el laboratorio

Al Prof. Dr. Ingolf F. Nes, por admitirme en el Laboratorio de Tecnología Microbiana (LMG) de la Universidad Agrícola de Noruega, Aas, donde se ha realizado una parte de esta Tesis Doctoral, lo cual ha contribuido significativamente en mi formación profesional. Asimismo, deseo darle las gracias ya que mi estancia en Noruega me ha permitido conocer este gran país, su maravillosa gente y sus costumbres, lo cual ha supuesto una experiencia muy positiva a nivel personal. Jeg vil gjerne takke min norske eksterneveileider, Prof. Dr. Ingolf F. Nes, fordi han aksepterte meg i LMG og for at han har vært like en far i Norge. Jeg vil også takke Dr. Helge Holo for hjelpen og alle de andre ved LMG (Grethe, Dzung, Agot, Merette, Per Arne, Trine, Vigdis, Marianne, Asta, Camille, Anne-Siri, Kari, Sigve, Morten, Janne, Vincent, Dag, May Bente, Kjell, Rigmor, May Britte, Anne-May, Wenche, Raija...) for at dere hjelper meg og for vennskapet deres. Det har vært en glede å arbeide med dere. Tusen takk alle sammen. Jeg beklager for feiltakelser.

I would like to thank very much Danny Doan because of his teaching and valuable helping in the computer analyses carried out in this work. During the nice time I have had in Norway he has always been ready to help me and he has become a very good friend.

A Juan Carlos Oscáriz, excelente amigo y compañero de trabajo, por sus muestras de afecto

y de ánimo durante el tiempo que coincidimos en Noruega, así como por las agradables tertulias e inolvidables barbacoas que mantuvimos los tres durante el verano del 97 en el fabuloso jardín de los señores Helge y Anne Lise Skuterud, en Aas.

I also want to express my great gratitude to Andrea Laukova for her support, her friendship, and for the nice time we have spent together in Aas..

A Ana Haza, amiga y compañera de trabajo y aventuras en Madrid, Estocolmo y Aas-Oslo, por el cariño que siempre me ha mostrado y por todos los buenos momentos que hemos compartido. A Carmen Herranz, amiga y miembro del equipo LAB, por su simpatía y cordialidad en LMG, y también por las deliciosas tortillas de patata que nos solía preparar y que me hacían sentir un poquito más cerca de España.

A todos aquéllos que, de forma generosa y desinteresada, suministraron los embutidos crudos curados (excelentes chorizos artesanales, que tras la toma de muestras, deleitaron nuestros paladares) empleados en este trabajo como fuente para el aislamiento de bacterias lácticas.

Al Dr. Bruno Pot, de la Universidad de Gantes (Bélgica), porque generosamente me confirmó la filiación taxonómica de las 12 cepas aisladas y seleccionadas en este trabajo.

Al Dr. Knut Sletten del Centro de Biotecnología de la Universidad de Oslo (Noruega), por habeme permitido obtener la composición y secuencia aminoacídica de la enterocina P y de las enterocinas B y A, así como al Dr. J. Metzger del Instituto de Química Orgánica de la Universidad Eberhard-Karls de Tübingen (Alemania), por realizar la espectrometría de masas de la enterocina B y de la enterocina P.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador con la que he realizado esta Tesis Doctoral. También estoy muy agradecida a la Unión Europea, por haber subvencionado este trabajo a través de los Proyectos de Investigación BRIDGE T-Project on Lactic Acid Bacteria (Contract BIOT-CT 910263) y BIOTECH (Contract BIOT-CT 943055) y a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, por la concesión de los Proyectos de Investigación ALI91-0255 y ALI94-1026.

A mis amigos, con los que he compartido maravillosos y no tan maravillosos momentos, muchas gracias.

A mis padres y a mis hermanos, por su cariño, entrega y comprensión durante todos estos años; sin vuestro apoyo y confianza no habría llegado hasta aquí.

A Marisa y a Pedro Cintas por su cariño y apoyo, pero sobre todo por el maravilloso hijo que tienen, Luis Cintas Izarra, con quien tuve el privilegio de contraer matrimonio.

Por último, a Luis, gracias por haber estado siempre, sin ti nunca lo habría logrado.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| CAPÍTULO I: EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR | 1 |
| CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN | 5 |
| II.1. Productos cárnicos crudos curados | 6 |
| II.1.1. Generalidades de los embutidos crudos curados | 6 |
| II.1.2. Evolución microbiológica durante la elaboración de los embutidos crudos curados | 7 |
| II.1.3. Relación entre las principales actividades metabólicas de las bacterias y las características finales de los embutidos crudos curados | 8 |
| II.1.4. Las bacterias lácticas como cultivos iniciadores y bioconservantes | 11 |
| II.1.5. Las bacterias lácticas como probióticos | 12 |
| II.2. Las bacterias lácticas | 13 |
| II.2.1. Características generales y consideraciones taxonómicas y filogenéticas de las bacterias lácticas | 14 |
| II.2.2. Diferenciación de las bacterias lácticas a nivel de género y especie | 22 |
| II.2.3. Bacterias lácticas del género <i>Enterococcus</i> | 25 |
| II.2.3.1. Características generales | 25 |
| II.2.3.2. Habitats | 28 |
| II.2.4. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas | 29 |
| II.3. Bacteriocinas de las bacterias lácticas | 33 |
| II.3.1. Definición y nomenclatura | 33 |
| II.3.2. Bacteriocinogenicidad de las bacterias lácticas | 35 |
| II.3.2.1. Bacteriocinas del género <i>Enterococcus</i> | 35 |
| II.3.2.2. Bacteriocinas de los géneros <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Leuconostoc</i> | 36 |
| II.3.2.3. Bacteriocinas de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Carnobacterium</i> | 43 |
| II.3.3. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas | 44 |
| II.4. Características de las bacteriocinas de las bacterias lácticas | 48 |
| II.4.1. Propiedades físico-químicas | 48 |
| II.4.2. Purificación a homogeneidad | 51 |
| II.4.3. Espectro de acción | 53 |
| II.4.4. Modo de acción | 53 |
| II.4.5. Inmunidad y resistencia | 56 |
| II.4.6. Biosíntesis | 57 |
| II.4.7. Procesamiento y transporte | 60 |
| II.4.8. Regulación de su producción | 64 |
| II.4.9. Caracterización genética | 66 |
| II.4.9.1. Localización y organización de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la nisina | 70 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.4.9.2. Localización y organización de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la sakacina P | 72 |
| II.4.9.3. Localización y organización de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la sakacina A | 73 |
| II.4.9.4. Localización y organización de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de las carnobacteriocinas BM1 y B2 | 74 |
| II.4.9.5. Localización y organización de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de las plantaricinas EF y JK | 75 |
| CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS | 77 |
| III.1. MATERIAL | 78 |
| III.1.1. Cepas bacterianas | 78 |
| III.1.1.1. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas | 78 |
| III.1.1.2. Microorganismos indicadores | 78 |
| III.1.1.3. Bacterias empleadas en las experiencias genéticas | 78 |
| III.1.2. Ácidos nucleicos | 78 |
| III.1.2.1. Plásmidos | 78 |
| III.1.2.2. Oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primeros) | 80 |
| III.1.2.3. Marcadores de tamaño molecular | 80 |
| III.1.3. Enzimas y proteínas | 80 |
| III.1.4. Medios de cultivo | 83 |
| III.1.4.1. Medios de cultivo empleados para el aislamiento y crecimiento de las bacterias lácticas | 83 |
| III.1.4.2. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de los microorganismos indicadores distintos a las bacterias lácticas | 84 |
| III.1.4.3. Medios empleados para la conservación de las cepas bacterianas | 85 |
| III.1.4.4. Medios de cultivo y reactivos empleados para la identificación y caracterización microbiológica y bioquímica de las bacterias lácticas | 85 |
| III.1.4.5. Medios de cultivo empleados para determinar el efecto de su composición en la producción de actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas | 91 |
| III.1.4.6. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de las bacterias utilizadas en las experiencias genéticas | 93 |
| III.1.5. Soluciones, tampones y geles | 94 |
| III.1.5.1. Tampón de resuspensión de los sobrenadantes libres de células concentrados | 94 |
| III.1.5.2. Soluciones y tampones empleados para la identificación y filiación taxonómica de las bacterias lácticas seleccionadas mediante el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) | 94 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.1.5.3. Soluciones y tampones empleados durante la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas y su caracterización bioquímica | 95 |
| III.1.5.4. Soluciones y tampones empleados para el aislamiento del ADN cromosómico y plasmídico | 97 |
| III.1.5.5. Soluciones, tampones y geles empleados para la visualización del ADN cromosómico y plasmídico | 100 |
| III.1.5.6. Tampones empleados para la preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α | 101 |
| III.1.5.7. Soluciones y tampones empleados para la reacción en cadena de la polimerasa | 102 |
| III.1.5.8. Soluciones y tampones empleados para la secuenciación del ADN | 102 |
| III.1.6. Kits comerciales | 104 |
| III.1.7. Material de laboratorio | 105 |
| III.2. MÉTODOS | 108 |
| III.2.1. Aislamiento y preselección de bacterias lácticas de embutidos crudos curados elaborados artesanalmente | 108 |
| III.2.2. Conservación de las cepas bacterianas | 108 |
| III.2.3. Estudio de la actividad antimicrobiana en medio sólido y líquido de las bacterias lácticas preseleccionadas | 109 |
| III.2.3.1. Método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura | 109 |
| III.2.3.2. Método de difusión en agar | 110 |
| III.2.3.2.1. Obtención de sobrenadantes libres de células | 110 |
| III.2.3.2.2. Obtención de sobrenadantes libres de células concentrados | 110 |
| III.2.3.2.3. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados | 110 |
| III.2.4. Actividad antimicrobiana exocelular de las bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos indicadores | 111 |
| III.2.5. Actividad antimicrobiana exocelular cruzada de las bacterias lácticas seleccionadas e inmunidad a sus sustancias antimicrobianas exocelulares | 111 |
| III.2.6. Caracterización microbiológica y bioquímica de las bacterias lácticas seleccionadas | 111 |
| III.2.6.1. Morfología y respuesta a la tinción de Gram | 111 |
| III.2.6.2. Actividad catalásica | 112 |
| III.2.6.3. Crecimiento en presencia/ausencia de oxígeno | 112 |
| III.2.6.4. Determinación del pH final de los cultivos | 112 |
| III.2.6.5. Producción de gas a partir de la glucosa | 112 |
| III.2.6.6. Producción de ácido y diacetilo a partir de la glucosa | 112 |
| III.2.6.7. Hidrólisis de la arginina | 113 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2.6.8. Producción de ácido sulfhídrico | 113 |
| III.2.6.9. Tolerancia a distintas concentraciones de cloruro sódico | 113 |
| III.2.6.10. Tolerancia a distintos valores de pH | 113 |
| III.2.6.11. Crecimiento a diversas temperaturas | 113 |
| III.2.6.12. Fermentación de hidratos de carbono | 113 |
| III.2.6.13. Pruebas complementarias para las bacterias lácticas del género <i>Enterococcus</i> | 114 |
| III.2.6.13.1. Crecimiento en presencia de un 0,04% de azida sódica | 114 |
| III.2.6.13.2. Fermentación del manitol en presencia de un 7,5% de cloruro sódico | 114 |
| III.2.6.13.3. Tolerancia a las sales biliares | 114 |
| III.2.6.13.4. Determinación del tipo de isómero del ácido-láctico (D-ácido láctico/L-ácido-láctico) | 114 |
| III.2.6.13.5. Actividad hemolítica | 115 |
| III.2.6.13.6. Actividad ureásica | 116 |
| III.2.7. Identificación y filiación taxonómica de las bacterias lácticas mediante el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) | 116 |
| III.2.8. Espectro de acción de <i>E. faecium</i> P13 frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 117 |
| III.2.9. Determinación de las condiciones experimentales óptimas para el crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 y para la producción de su actividad antimicrobiana | 117 |
| III.2.9.1. Efecto de la composición del medio de cultivo | 117 |
| III.2.9.2. Efecto de la tensión de oxígeno | 118 |
| III.2.9.3. Efecto de la temperatura | 118 |
| III.2.9.3.1. Cinética del crecimiento y de la producción de actividad antimicrobiana | 118 |
| III.2.9.3.2. Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano | 118 |
| III.2.10. Caracterización bioquímica de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 | 120 |
| III.2.10.1. Estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 parcialmente purificada | 120 |
| III.2.10.1.1. Efecto de diversos enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos | 120 |
| III.2.10.1.2. Efecto combinado del pH y de la temperatura | 120 |
| III.2.10.1.3. Termorresistencia a pH ácido y neutro | 121 |
| III.2.10.1.4. Efecto del almacenamiento a distintas temperaturas y pHs | 123 |
| III.2.10.2. Determinación del modo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 parcialmente purificada frente a <i>Ls. monocytogenes</i> ScottA | 123 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2.10.3. Purificación a homogeneidad de las sustancias antimicrobianas exocelulares de <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 | 124 |
| III.2.10.3.1. Fundamento del proceso de purificación | 124 |
| III.2.10.3.2. Protocolo de purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 | 126 |
| III.2.10.3.3. Protocolo de purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de <i>E. faecium</i> T136 | 128 |
| III.2.10.3.4. Detección y cuantificación de la actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación | 128 |
| III.2.10.3.5. Determinación de la concentración de proteína (bacteriocina) de las muestras purificadas | 129 |
| III.2.10.4. Optimización de la producción de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> T136 y purificación a homogeneidad de las mismas | 130 |
| III.2.10.4.1. Optimización de la producción de las bacteriocinas | 130 |
| III.2.10.4.2. Purificación a homogeneidad de las bacteriocinas | 130 |
| III.2.10.5. Determinación de la composición y secuencia aminoacídica de las bacteriocinas | 132 |
| III.2.10.6. Determinación del tamaño molecular de las bacteriocinas por espectrometría de masas | 133 |
| III.2.10.7. Efecto del ditiotritol (DTT) en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas | 133 |
| III.2.10.8. Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM) de las bacteriocinas purificadas a homogeneidad frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 134 |
| III.2.11. Caracterización genética de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 | 134 |
| III.2.11.1. Obtención de mutantes de <i>E. faecium</i> P13 deficientes en la producción de bacteriocina y/o en la inmunidad a la misma | 134 |
| III.2.11.1.1. Aislamiento de colonias de <i>E. faecium</i> P13 de fenotipos Bac+Imn+ | 135 |
| III.2.11.1.2. Tratamiento de los cultivos con novobiocina y detección de las colonias de fenotipos Bac- Imn- | 135 |
| III.2.11.2. Aislamiento y visualización del ADN plasmídico y cromosómico de <i>E. faecium</i> P13, de sus mutantes seleccionados y de <i>E. faecium</i> T136 | 136 |
| III.2.11.2.1. Aislamiento del ADN plasmídico y cromosómico | 136 |
| III.2.11.2.2. Visualización del ADN plasmídico y cromosómico | 137 |
| III.2.11.3. Análisis de restricción del ADN total de <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 | 139 |
| III.2.11.4. Obtención y preparación del vector de ligamiento pBluescript II SK+ | 139 |
| III.2.11.4.1. Obtención del vector de ligamiento pBluescript II SK+ | 140 |
| III.2.11.4.1.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α | 140 |
| III.2.11.4.1.2. Transformación química de <i>E. coli</i> DH5 α con el fagémido pBluescript II SK+ | 140 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.2.11.4.1.3. Aislamiento y purificación del fagémido pBluescript II SK+ | 141 |
| III.2.11.4.2. Preparación del vector de ligamiento pBluescript II SK+ | 142 |
| III.2.11.4.2.1. Tratamiento con enzimas de restricción | 142 |
| III.2.11.4.2.2. Tratamiento con fosfatasa alcalina | 142 |
| III.2.11.5. Ligamiento de los fragmentos de restricción del ADN total de <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 en el fagémido pBluescript II SK+ | 143 |
| III.2.11.6. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 143 |
| III.2.11.6.1. Fundamento de la técnica de PCR y etapas de la reacción | 143 |
| III.2.11.6.2. Diseño de oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primeros) | 145 |
| III.2.11.6.3. Modalidades de la técnica de PCR | 145 |
| III.2.11.6.4. Reacciones de amplificación del ADN | 146 |
| III.2.11.6.5. Visualización y análisis de los productos de PCR | 147 |
| III.2.11.7. Extracción de los productos de PCR de los geles de agarosa | 147 |
| III.2.11.8. Purificación de los productos de PCR | 148 |
| III.2.11.9. Ligamiento de los productos de PCR en el fagémido pBluescript II SK+ | 149 |
| III.2.11.9.1. Tratamiento de los productos de PCR con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I | 149 |
| III.2.11.9.2. Ligamiento de los productos de PCR tratados con el fragmento Klenow en el fagémido pBluescript II SK+ | 150 |
| III.2.11.10. Técnica de secuenciación del ADN | 150 |
| III.2.11.10.1. Fundamento de la técnica de secuenciación del ADN | 151 |
| III.2.11.10.2. Obtención y preparación del ADN de cadena sencilla | 151 |
| III.2.11.10.3. Reacciones de hibridación del ADN con los cebadores de secuenciación | 153 |
| III.2.11.10.4. Reacción de elongación y marcado radiactivo con S ³⁵ | 153 |
| III.2.11.10.5. Reacciones de terminación con didesoxinucleótidos | 154 |
| III.2.11.10.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida | 154 |
| III.2.11.10.7. Procesado de los geles de secuenciación y autorradiografía | 155 |
| III.2.11.11. Análisis informático de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas | 156 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | 158 |
| IV.1. Aislamiento y selección de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en medio sólido a partir de embutidos crudos curados | 159 |
| IV.2. Identificación y selección de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas exocelulares en medio líquido | 161 |
| IV.3. Actividad antimicrobiana exocelular de las 12 bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos indicadores | 163 |
| IV.4. Actividad antimicrobiana exocelular cruzada de las 12 bacterias lácticas seleccionadas e inmunidad a sus sustancias antimicrobianas exocelulares | 166 |
| IV.5. Caracterización microbiológica y bioquímica de las 12 bacterias | |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| lácticas seleccionadas | 169 |
| III.5.1. Morfología y respuesta a la tinción de Gram | 169 |
| III.5.2. Actividad catalásica | 169 |
| III.5.3. Crecimiento en presencia/ausencia de oxígeno | 169 |
| III.5.4. Determinación del pH final de los cultivos | 169 |
| III.5.5. Producción de gas a partir de la glucosa | 169 |
| III.5.6. Producción de ácido y diacetilo a partir de la glucosa | 169 |
| III.5.7. Hidrólisis de la arginina | 171 |
| III.5.8. Producción de ácido sulfhídrico | 171 |
| III.5.9. Tolerancia a distintas concentraciones de cloruro sódico | 171 |
| III.5.10. Tolerancia a distintos valores de pH | 171 |
| III.5.11. Crecimiento a diversas temperaturas | 171 |
| IV.5.12. Patrones de fermentación de hidratos de carbono | 171 |
| IV.5.13. Pruebas complementarias para las bacterias lácticas del género <i>Enterococcus</i> | 175 |
| IV.6. Identificación y filiación taxonómica de las 12 bacterias lácticas seleccionadas mediante el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) | 176 |
| IV.7. Espectro de acción de <i>E. faecium</i> P13 frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 178 |
| IV.8. Condiciones experimentales óptimas para el crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 y para la producción de su actividad antimicrobiana | 178 |
| IV.8.1. Efecto de la composición del medio de cultivo | 180 |
| IV.8.2. Efecto de la tensión de oxígeno | 180 |
| IV.8.3. Efecto de la temperatura | 182 |
| IV.8.3.1. Cinética del crecimiento y de la producción de actividad antimicrobiana | 182 |
| IV.8.3.2. Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano | 185 |
| IV.9. Caracterización bioquímica de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 | 185 |
| IV.9.1. Estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 parcialmente purificada | 185 |
| IV.9.1.1. Efecto de diversos enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos | 186 |
| IV.9.1.2. Efecto combinado del pH y de la temperatura | 186 |
| IV.9.1.3. Estudio de la termorresistencia a pH ácido y neutro | 186 |
| IV.9.1.4. Efecto del almacenamiento a distintas temperaturas y pHs | 188 |
| IV.9.2. Modo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 parcialmente purificada frente a <i>Ls. monocytogenes</i> ScottA | 191 |
| IV.9.3. Purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>E. faecium</i> P13 | 191 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV.9.4. Composición aminoacídica de la bacteriocina P | 193 |
| IV.9.5. Secuencia aminoacídica de la bacteriocina P | 197 |
| IV.9.6. Efecto del ditiotritol en la actividad antimicrobiana de la enterocina P | 200 |
| IV.9.7. Concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina P frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 200 |
| IV.10. Caracterización genética de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 | 202 |
| IV.10.1. Obtención de mutantes de <i>E. faecium</i> P13 deficientes en la producción de enterocina P y en su inmunidad | 202 |
| IV.10.2. Aislamiento y visualización del ADN total de <i>E. faecium</i> P13 y de los mutantes seleccionados | 202 |
| IV.10.3. Secuenciación del gen estructural de la enterocina P y de su hipotético gen de inmunidad | 204 |
| IV.10.3.1. Obtención de la primera secuencia nucleotídica | 204 |
| IV.10.3.2. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' | 207 |
| IV.10.3.3. Secuenciación desde el final del gen estructural hacia su extremo 5' | 207 |
| IV.10.3.4. Secuenciación desde la mitad del gen estructural hacia su extremo 5' | 209 |
| IV.10.3.5. Avance de la secuenciación hacia el extremo 5' | 209 |
| IV.10.4. Análisis del gen estructural de la enterocina P, de su hipotético gen de inmunidad y de las regiones adyacentes. Identificación de las regiones nucleotídicas relacionadas con el inicio de la transcripción y de la traducción | 210 |
| IV.10.5. Análisis de la secuencia aminoacídica de la enterocina P, de su extensión N-terminal y de su hipotética proteína de inmunidad. Parámetros físico-químicos | 214 |
| IV.11. Caracterización bioquímica parcial de la enterocina B de <i>E. faecium</i> T136 | 218 |
| IV.11.1. Purificación a homogeneidad y determinación de la secuencia aminoacídica parcial de las sustancias antimicrobianas exocelulares de <i>E. faecium</i> T136 | 218 |
| IV.11.2. Optimización de la producción y purificación a homogeneidad de la enterocina B y de la enterocina A | 226 |
| IV.11.2.1. Optimización de la producción de la enterocina B y de la enterocina A | 226 |
| IV.11.2.2. Purificación a homogeneidad de la enterocina B y de la enterocina A | 229 |
| IV.11.3. Composición aminoacídica de la enterocina B | 233 |
| IV.11.4. Secuencia aminoacídica de la enterocina B | 233 |
| IV.11.5. Tamaño molecular de la enterocina B por espectrometría de masas | 236 |
| IV.11.6. Efecto del ditiotritol (DTT) en la actividad antimicrobiana de la enterocina B y de la enterocina A | 236 |
| IV.11.7. Concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina B y de la enterocina A frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 236 |
| IV.12. Caracterización genética de la enterocina B de <i>E. faecium</i> T136 | 239 |
| IV.12.1. Aislamiento y visualización del ADN total de <i>E. faecium</i> T136 | 239 |
| IV.12.2. Secuenciación del gen estructural de la enterocina B y de las regiones | |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| adyacentes | 240 |
| IV.12.2.1. Obtención de la primera secuencia nucleotídica | 240 |
| IV.12.2.2. Secuenciación desde la mitad del gen estructural hacia su extremo 3' | 243 |
| IV.12.2.3. Secuenciación desde el final del gen estructural hacia su extremo 5' | 243 |
| IV.12.3. Análisis del gen estructural de la enterocina B y de las regiones adyacentes. Identificación de las regiones nucleotídicas relacionadas con la transcripción y con el inicio de la traducción | 245 |
| IV.12.4. Análisis de la secuencia aminoacídica de la enterocina B y de su extensión N-terminal. Parámetros físico-químicos | 247 |
| IV.12.5. Secuenciación parcial del gen estructural de la enterocina A | 250 |
| IV.12.6. Análisis del gen estructural de la enterocina A y de la región adyacente. Parámetros físico-químicos de la enterocina A | 251 |
| IV.12.7. Amplificación por PCR de los genes estructurales de la enterocina B y de la enterocina A de <i>E. faecium</i> T136 y <i>E. faecium</i> CTC492 | 253 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN | 256 |
| V.1. Aislamiento de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de embutidos crudos curados elaborados artesanalmente | 257 |
| V.1.1. Actividad antimicrobiana en medio sólido de las bacterias lácticas aisladas | 257 |
| V.1.2. Identificación y selección de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en medio líquido | 259 |
| V.1.3. Caracterización microbiológica y bioquímica de las 12 bacterias lácticas seleccionadas. Filiación taxonómica | 262 |
| V.1.4. Espectro de acción, inmunidad y actividad antimicrobiana cruzada de las 12 bacterias lácticas seleccionadas | 265 |
| V.2. Caracterización bioquímica de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 y de la enterocina B de <i>E. faecium</i> T136 | 268 |
| V.2.1. Condiciones experimentales óptimas para el crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 y para la producción de enterocina P | 268 |
| V.2.1.1. Efecto de la composición del medio de cultivo | 268 |
| V.2.1.2. Efecto de la tensión de oxígeno y de la temperatura de incubación | 271 |
| V.2.2. Estabilidad físico-química y modo de acción de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 parcialmente purificada | 273 |
| V.2.3. Optimización de la producción de la enterocina B y de la enterocina A de <i>E. faecium</i> T136 | 275 |
| V.2.4. Purificación a homogeneidad de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 y de las enterocinas B y A de <i>E. faecium</i> T136 | 277 |
| V.2.4.1. Purificación a homogeneidad de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 | 278 |
| V.2.4.2. Purificación a homogeneidad de las enterocinas B y A de <i>E. faecium</i> T136 | 279 |
| V.2.5. Espectro de acción de la enterocina P, enterocina B y enterocina A frente a | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria | 281 |
| V.2.6. Estudio comparativo de la secuencia aminoacídica de la enterocina P, enterocina B, enterocina A y otras bacteriocinas de la clase II | 284 |
| V.2.7. Estudio comparativo de los parámetros físico-químicos de la enterocina P, enterocina B, enterocina A y otras bacteriocinas de la clase II | 288 |
| V.2.8. Relación entre la estructura peptídica de la enterocina P, enterocina B y enterocina A y su actividad biológica | 292 |
| V.3. Caracterización genética de la enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 y de la enterocina B de <i>E. faecium</i> T136 | 296 |
| V.3.1. Análisis de la secuencia nucleotídica de los genes estructurales de la enterocina P y enterocina B y del gen de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P | 297 |
| V.3.2. Estudio comparativo de la secuencia aminoacídica y de los parámetros físico-químicos de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P y de las de otras bacteriocinas de la clase II | 300 |
| V.3.3. Relación entre la extensión N-terminal de la enterocina P y enterocina B y su procesamiento y transporte | 303 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES | 313 |
| CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA | 317 |

CAPÍTULO I.

EXPOSICIÓN GENERAL

DEL

PROBLEMA A INVESTIGAR

Los alimentos comienzan a deteriorarse casi inmediatamente después de la recolección de los vegetales, la caza de los animales, el sacrificio de los animales de abasto y la elaboración de los productos derivados. El conocimiento de la composición química y de la ecología microbiana de los alimentos, unido a los avances tecnológicos producidos, ha permitido desarrollar un gran número de nuevas metodologías que, junto a las tradicionales, como la salazón, la desecación, la congelación, el ahumado, etc., encuentran su aplicación en la moderna Tecnología de los Alimentos.

La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos de las que dispone actualmente la industria alimentaria están basadas en complejos procesos tecnológicos y en el empleo de conservantes químicos, que permiten mantener un suministro regular de alimentos en cualquier parte del Planeta y en cualquier época del año. No obstante, las modificaciones de los patrones demográficos y socioeconómicos de la sociedad actual y las preferencias de los consumidores por determinados tipos de alimentos plantea la necesidad de buscar nuevas alternativas de conservación que, unidas a las ya existentes, permitan la obtención de productos más “naturales” y menos procesados, pero que además garanticen su calidad higiénica y vida útil. En este contexto, se ha sugerido recientemente el empleo de las bacterias lácticas y de sus metabolitos como “bioconservantes” en la industria alimentaria. Las bacterias lácticas contribuyen favorablemente en la conservación de los alimentos en general y de los productos cárnicos fermentados en particular debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en la materia prima y convertirse, por lo tanto, en la flora predominante de estos productos. Los principales mecanismos de antagonismo microbiano son la competencia por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato y la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), con el consiguiente descenso del pH. Además, las bacterias lácticas producen otras sustancias antimicrobianas como el etanol, el dióxido de carbono, el diacetilo, el acetaldehído, el peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, el benzoato, los isómeros D de los aminoácidos, la reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, sustancias proteicas denominadas bacteriocinas. Por lo tanto, al emplear las bacterias lácticas como cultivos iniciadores y protectores en los productos fermentados se incrementa su calidad higiénica y su vida útil y se estandarizan los procesos fermentativos y las características organolépticas del producto.

En los últimos años ha aumentado el interés, tanto de la comunidad científica como de los sectores industriales, en la investigación de las bacteriocinas como bioconservantes naturales de los alimentos, formando parte de un sistema de barreras múltiples, lo que permitiría reducir el empleo de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados, sin que esto vaya en detrimento de su seguridad y de su calidad higiénico-sanitaria. Una de las causas de este creciente interés por las bacteriocinas es la aceptación internacional de la nisina en 1988 como bioconservante en determinados tipos de alimentos. Otro factor decisivo en el impulso de la investigación sobre las bacteriocinas es el reconocimiento de que algunos microorganismos patógenos emergentes, como *Listeria monocytogenes*, se desarrollan a las temperaturas habituales de refrigeración de los alimentos. En este sentido, la tendencia actual a eliminar el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y a utilizar la refrigeración como mecanismo primario de conservación supone un riesgo potencial para el

consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena del frío durante el procesado, manipulación, distribución o almacenamiento de este tipo de productos. Por lo tanto, con el precedente de la inocuidad de la nisina y de la autorización de su empleo en algunos alimentos, existe la posibilidad de sugerir la utilización como bioconservantes alimentarios de otras bacteriocinas de amplio espectro de acción frente a microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos, una vez que éstas hayan sido caracterizadas adecuadamente.

En este contexto el objetivo principal de este trabajo es el aislamiento y la identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas a partir de embutidos crudos curados elaborados artesanalmente en diversas localidades españolas. Una vez seleccionadas las cepas bacteriocinogénicas con un espectro de acción antimicrobiana más interesante, se determinará su filiación taxonómica y se procederá a su caracterización microbiológica y bioquímica. A continuación, se caracterizarán bioquímica y genéticamente la(s) sustancia(s) responsable(s) de su actividad antimicrobiana exocelular, lo que permitirá posiblemente sugerir su aplicación como bioconservante en la industria alimentaria. Como tal bioconservante es de esperar que aumente la calidad higiénica y la vida útil de la carne y de los productos cárnicos y que permita disminuir las concentraciones de conservantes químicos empleadas habitualmente en la elaboración de estos productos. Para lograr los objetivos propuestos es necesario desarrollar el esquema de trabajo que se describe a continuación:

1.- Aislamiento, a partir de embutidos crudos curados elaborados artesanalmente, de bacterias lácticas antagonistas del crecimiento de otros microorganismos e identificación y selección de aquéllas cuya actividad antimicrobiana se deba a la producción de compuestos exocelulares difusibles en medio líquido.

2.- Evaluación de la actividad antimicrobiana exocelular de las bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria, entre los que se incluyen bacterias lácticas de diversos hábitats, *Pseudomonas* spp. psicrótrofas de la carne refrigerada, microorganismos alterantes, como *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp. y microorganismos patógenos, productores de toxiinfecciones alimentarias, como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatógeno y *Salmonella typhimurium*.

3.- Identificación, filiación taxonómica y caracterización microbiológica y bioquímica de las bacterias lácticas que muestren el espectro de acción más amplio e interesante.

4.- Determinación de las condiciones experimentales óptimas (ej. medio de cultivo, tensión de oxígeno, temperatura y pH) para el crecimiento de las cepas seleccionadas y para la producción de su actividad antimicrobiana exocelular.

5.- Estudio de la estabilidad físico-química (ej. tratamientos enzimáticos y térmicos, pH y almacenamiento en congelación y refrigeración) y evaluación del modo de acción de la sustancia

antimicrobiana responsable de su actividad antimicrobiana.

6.- Purificación a homogeneidad, mediante diversas técnicas cromatográficas (ej. cromatografía de filtración en geles, -intercambio iónico, -interacción hidrofóbica y -fase reversa, FPLC), de la(s) bacteriocina(s) responsable(s) de la actividad antimicrobiana exocelular de las bacterias lácticas seleccionadas.

7.- Determinación de la composición y secuencia aminoacídica de las bacteriocinas purificadas a homogeneidad.

8.- Determinación por espectrometría de masas del tamaño molecular de las bacteriocinas.

9.- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas purificadas a homogeneidad frente a diversos microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

10.- Aislamiento y visualización del ADN cromosómico y plasmídico de las cepas seleccionadas y obtención de mutantes deficientes en la producción de la(s) bacteriocina(s) y/o en su inmunidad.

11.- Tratamiento del ADN de las cepas seleccionadas con diversos enzimas de restricción y ligación en un vector fagémido.

12.- Obtención, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de diversos fragmentos de ADN que contienen los determinantes genéticos que codifican la producción y/o inmunidad de las bacteriocinas seleccionadas.

13.- Y, finalmente, secuenciación de diversos fragmentos de PCR, mediante el método didesoxi de finalización de cadena, y determinación de la secuencia nucleotídica del gen estructural de las bacteriocinas seleccionadas y/o del gen de su hipotética proteína de inmunidad, así como de las regiones relacionadas con su transcripción y traducción.

CAPÍTULO II.

INTRODUCCIÓN

II.1. PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDOS CURADOS

Tradicionalmente, la curación, la salazón, la desecación y el ahumado han constituido los principales métodos naturales de conservación de los alimentos. En la actualidad, estas técnicas continúan siendo los principales métodos de conservación empleados en los países en vías de desarrollo, debido a que son relativamente baratos y permiten obtener productos de alta calidad higiénica y extensa vida útil. No obstante, en los países desarrollados, el empleo de técnicas como la refrigeración y el envasado a vacío o en atmósferas modificadas ha desplazado a las técnicas tradicionales como métodos de conservación, y por el contrario, éstas han adquirido una nueva dimensión como procesos de obtención de una extensa gama de productos con características organolépticas y reológicas muy peculiares y variadas que permiten satisfacer los requerimientos de los consumidores.

El curado es una técnica derivada de la salazón que se aplica en la actualidad a numerosos productos cárnicos, si bien, el significado del término curado tiene distintos matices según los países y el tipo de producto. En nuestro país se denominan curados a los productos cárnicos, tanto piezas como mezclas de carnes picadas (pastas), que han sido sometidos a un proceso de maduración y secado durante el que tienen lugar una serie de procesos fermentativos bacterianos; sin embargo, en el ámbito internacional, el término curado se aplica a todos los productos cárnicos que han sido tratados con sal, nitratos y/o nitritos. El curado en seco es el proceso más antiguo y consiste en someter la masa cárnica a la acción de una mezcla de los ingredientes del curado (sal, nitratos y/o nitritos) y los coadyuvantes (ej. ascorbatos, fosfatos y azúcares), los cuales se solubilizan con los jugos de la carne y penetran en su interior por difusión. En el proceso por vía húmeda, los ingredientes y coadyuvantes del curado se solubilizan con agua para formar una salmuera que actúa como vehículo de penetración en la carne. Tras el periodo de maduración, los productos cárnicos se someten a un proceso de secado, en el caso de los productos curados en seco, o a un tratamiento térmico de cocción, si se trata de productos curados con salmuera. Finalmente, tanto los productos crudos curados como los productos cocidos curados se pueden someter a un tratamiento de ahumado dependiendo del tipo de producto y de las costumbres gastronómicas de cada país (Flores, 1994).

La quinta parte de la carne que se produce en España se destina a la fabricación de productos curados, lo que supone una producción anual próxima a las 400.000 toneladas, siendo la carne de porcino la materia prima más empleada (Vila Aguilar, 1994). Entre los productos cárnicos crudos curados se incluyen, entre otros, los jamones curados, los embutidos crudos curados (chorizo, salchichón y fuet) y, por último, el bacon y el lomo embuchado (Flores, 1994).

II.1.1. Generalidades de los embutidos crudos curados

El sabor característico de los embutidos crudos curados es debido, principalmente, a la fermentación bacteriana que determina la acumulación de ácido láctico y otros productos de fermentación desconocidos. El proceso de fermentación microbiológica que tiene lugar durante su elaboración depende de la carga microbiana presente inicialmente en la materia prima, principalmente en la grasa y en la carne, y de la que se introduzca posteriormente durante la manipulación previa a la embutición, así como de las condiciones empleadas en los tratamientos de maduración y secado. Durante el proceso de fermentación-desecación de los embutidos

crudos curados se producen una serie de modificaciones bioquímicas (ej. disminución del contenido en agua, reducción de nitratos y nitritos, aumento de la concentración salina y acidificación y descenso del pH como consecuencia de la fermentación de los azúcares) y reacciones proteolíticas y lipolíticas que serán las responsables de las propiedades organolépticas y reológicas características y de la calidad higiénica del producto final (Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995).

Los embutidos crudos curados se clasifican en dos categorías atendiendo al grado de secado y al pH final del producto. Los embutidos crudos curados semisecos se caracterizan por sufrir una fermentación rápida a temperaturas elevadas (21-46°C) y por presentar un pH final inferior a 5,3. El periodo de secado es corto y la humedad relativa del producto final es de un 50%. En este grupo de embutidos se encuentran, entre otros, los salchichones alemanes tipo *thuringer* y *cervelat* y la *summer sausage* producida en EEUU. Los embutidos crudos curados secos se someten a una fermentación lenta (2-3 días) a temperaturas bajas (11-23°C) y con una humedad relativa alta (85-95%). El periodo de secado es largo (20 días-varios meses) y se realiza en cámaras frías (10-15°C) con una humedad relativa menor (75%). El producto final presenta una humedad del 30-45% y un pH final entre 4,8 y 5,1. Este tipo de embutidos se producen en Alemania (*rohwrurst*), en Italia (*salami*) y en España (chorizo, salchichón, fuet, entre otros) (Flores, 1995).

II.1.2. Evolución microbiológica durante la elaboración de los embutidos crudos curados

La flora microbiana que se encuentra inicialmente en la masa cárnica de los embutidos (entre 10^5 - 10^6 ufc/g) es muy variada y de procedencia muy heterogénea; así, por ejemplo, se pueden encontrar bacterias saprófitas (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Brucella*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Brochotrix*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*); bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*), mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Thamnidium*, *Trichosporum*) y levaduras (*Debariomyces*). Asimismo, también se pueden encontrar bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* (*Ls. monocytogenes*), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatógeno (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*), *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*), *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*) y, ocasionalmente, *Cl. botulinum* (Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995).

La evolución microbiológica global durante la elaboración de los embutidos suele seguir un patrón bastante común, que se caracteriza por la desaparición rápida de la práctica totalidad de los microorganismos aerobios Gram-negativos, que son los principales responsables de la contaminación de las carnes frescas, así como por una intensa multiplicación de bacterias de la familia *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), de bacterias lácticas (principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*) y, a veces, de mohos y levaduras (Fournand, 1976; Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995). En este sentido, se ha demostrado que las bacterias lácticas y las micrococáceas poseen una mayor resistencia a la actividad antimicrobiana de los nitritos que las bacterias Gram-negativas y determinados patógenos como *Cl. botulinum*, lo que inicia su selección positiva desde el comienzo de la maduración de los embutidos (Flores, 1994). La

multiplicación precoz de las micrococáceas en el interior de la masa cárnica provoca una ligera acidificación del medio que favorece la multiplicación de los lactobacilos e inhibe el desarrollo de algunas bacterias Gram-negativas. A continuación, las bacterias lácticas sustituyen a las micrococáceas en lo que concierne a la acidificación y se convierten en la flora mayoritaria, al estar bien adaptadas a la acidez, al cloruro sódico y a la anaerobiosis (Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995). Por otra parte, las bacterias lácticas aseguran su desarrollo y prevalencia en estos productos durante el proceso de maduración compitiendo exitosamente por los nutrientes disponibles (glucosa y arginina, entre otros) e inhibiendo el crecimiento del resto de la flora microbiana mediante la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente) y otras sustancias antimicrobianas como, por ejemplo, etanol, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990; Hernández *et al.*, 1993). En lo que respecta a los mohos y levaduras, éstos colonizan con frecuencia la superficie de los embutidos poco secos y/o no ahumados, siempre que la humedad relativa durante la maduración no sea demasiado baja. Asimismo, también se ha detectado la presencia de levaduras en el interior de los productos fermentados y madurados (Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995).

II.1.3. Relación entre las principales actividades metabólicas de las bacterias y las características finales de los embutidos crudos curados

Las características organolépticas y reológicas finales de los embutidos crudos curados se deben principalmente a los procesos fermentativos de los azúcares y acidificación de la masa cárnica de las bacterias lácticas, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y a las actividades proteolíticas, lipolíticas y nitrato-reductasa de las bacterias de la familia *Micrococcaceae* así como, aunque en menor medida, a las actividades enzimáticas de hongos y levaduras (Flores, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995). El papel que ejercen las bacterias lácticas y sus metabolitos en la seguridad, calidad higiénica y vida útil de estos productos se describirá en las secciones II.1.4 y II.2.4.

II.1.3.1. Fermentación de hidratos de carbono

La principal actividad metabólica de las bacterias lácticas es la fermentación de los hidratos de carbono con la consiguiente producción de ácidos orgánicos. Estos microorganismos sintetizan mayoritariamente ácido láctico, a partir de la fermentación de las hexosas (glucosa) y algunos disacáridos (sacarosa y lactosa), aunque también pueden producir ácido acético a partir de las pentosas o del ácido glucónico (sección II.2.1). La producción de ácidos provoca un descenso del pH que permite que se produzca una liberación rápida y homogénea de la humedad presente en la masa cárnica, provocando al mismo tiempo una disminución de la actividad de agua (a_w), lo que contribuye a preservar el producto final frente a microorganismos alterantes y/o patógenos (Lücke y Hechelmann, 1987). Asimismo, cuando el valor del pH es inferior a 5,3, disminuye la solubilidad de las proteínas y su capacidad de retención de agua, produciéndose la coagulación de las mismas, lo que proporciona la textura característica de los embutidos y permite su loncheamiento (Frey, 1983). No obstante, la disminución del pH debe controlarse, ya que productos demasiados ácidos pueden tener un fuerte sabor picante (Lücke, 1987); asimismo,

una cantidad excesiva de ácido láctico puede inhibir otras actividades metabólicas como la lipólisis, la proteólisis o la reducción de nitratos (al impedir la actuación del enzima nitrato-reductasa), todas ellas de gran importancia para conseguir las características organolépticas típicas del producto final.

Por otra parte, a partir del piruvato (metabolito intermediario de la fermentación de los azúcares) se pueden producir otros compuestos como la acetofna, el butanodiol, el acetaldehído, el etanol y el diacetilo, que también intervienen en el aroma final de los embutidos (Langner, 1972).

II.1.3.2. Degradación de lípidos

La lipólisis es otra de las actividades metabólicas importantes durante la fermentación de los productos cárnicos y que continua durante el periodo de maduración, traducándose en un aumento constante de los monoglicéridos, los diglicéridos y los ácidos grasos libres. Los ácidos oleico, linoleico, esteárico y palmítico son los mayoritarios y pueden ser metabolizados a alcoholes, cetonas y aldehídos (Langner, 1972). Las bacterias de la familia *Micrococcaceae* junto a los enzimas tisulares de la masa cárnica intervienen activamente en la degradación de los lípidos y en la consiguiente formación de sustancias sápidas y aromáticas que contribuyen al sabor y aroma característicos de los embutidos; sin embargo, la actividad lipolítica de las bacterias lácticas es muy limitada y recae fundamentalmente sobre los mono- y diglicéridos y triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta. Teniendo en cuenta que la concentración de estas sustancias es baja al principio de la maduración, será necesaria una lipólisis previa, probablemente realizada por las micrococaceas, para que actúen las lipasas de las bacterias lácticas (Hammes *et al.*, 1990; Ordóñez *et al.*, 1995). No obstante, es interesante mencionar que las bacterias lácticas del género *Carnobacterium* poseen la capacidad de hidrolizar la tributirina (Papon *et al.*, 1990). Según su naturaleza, los productos del metabolismo lipolítico pueden influir favorablemente en el aroma y el sabor del producto final o, por el contrario, producir una alteración del mismo (ej. rancidez debida a los aldehídos formados por la peroxidación de las grasas). Asimismo, los ácidos grasos liberados durante el proceso lipolítico ejercen un efecto inhibitor sobre las bacterias Gram-negativas (Papon *et al.*, 1990).

II.1.3.3. Degradación de proteínas

La proteólisis da lugar a la formación de aminoácidos y péptidos que intervienen en el sabor característico del producto final, pero no debe ser excesiva porque podría alterar su consistencia (Lücke, 1987). El papel específico que desempeñan los enzimas bacterianos y las proteasas tisulares (catepsinas) en este proceso no se ha determinado aún con exactitud. Las bacterias lácticas del género *Carnobacterium* y algunas especies de lactobacilos tienen actividad peptidásica débil, por lo que se liberan aminoácidos como la fenilalanina, la lisina, el ácido glutámico, la alanina, la valina y la isoleucina, con lo que se incrementa el valor nutritivo del producto final (Platt, 1964). Asimismo, se ha comprobado que la actividad proteolítica de las micrococáceas contribuye de forma destacada en la proteólisis en general y en la liberación de aminoácidos en el embutido (Sajber *et al.*, 1971; Ordóñez *et al.*, 1995). Los aminoácidos pueden sufrir una descarboxilación y transformarse en aminas secundarias (ej. histamina, tiramina y putrescina),

las cuales pueden reaccionar posteriormente con los nitritos y transformarse en nitrosaminas (compuestos cancerígenos) (Dierick *et al.*, 1974). Diversos estudios han evidenciado que la concentración de histamina en los productos de fermentación natural (no controlada) es más elevada que en los productos en los que se emplean cultivos iniciadores comerciales dado que éstos carecen de descarboxilasas (Eitenmiller *et al.*, 1978; Smith y Palumbo, 1983; Bacus, 1986).

Los embutidos que se maduran con una capa superficial de mohos (principalmente del género *Penicillium*) desarrollan un aroma característico que está relacionado con la actividad enzimática (lipolítica y proteolítica) de estos microorganismos. Las lipasas y proteasas que producen dan lugar a compuestos de pequeño tamaño molecular, sustancias sápidas y aromáticas que contribuyen al sabor y aroma típico de los embutidos crudos curados. Asimismo, la flora fúngica evita la formación de costra superficial y favorece una deshidratación uniforme del embutido, además de ejercer un efecto antioxidante, ya que reduce la tensión de oxígeno en la superficie, degrada los peróxidos y protege del efecto prooxidante de la luz, lo que conduce a una estabilización del color del curado (Ordóñez *et al.*, 1995).

II.1.3.4. Reducción de nitratos a nitritos

Los nitritos, e indirectamente los nitratos, se utilizan en la elaboración de los embutidos crudos curados por el papel que ejercen en la obtención de su color rojo característico, por su actividad antimicrobiana y porque contribuyen al desarrollo de su aroma y sabor (Flores, 1994). En las reacciones químicas del desarrollo del color, la mayoría de los autores coinciden en la formación transitoria del pigmento metamioglobina, como consecuencia de la oxidación directa del pigmento mioglobina por el nitrito. Posteriormente, la metamioglobina tiene que ser reducida y combinada con el óxido nítrico (NO) para formar el complejo nitrosomioglobina, de color rojo vivo estable, característico de los productos cárnicos curados (Flores, 1994). Las especies de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* poseen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos, lo que es de una gran importancia para la consecución del color característico de los embutidos crudos curados (Deibel *et al.*, 1961). Asimismo, se ha comprobado recientemente que determinadas especies del género *Lactobacillus* poseen actividad nitrato reductasa hemodependiente (Hammes *et al.*, 1990). Por otra parte, el bajo pH de estos productos como consecuencia del desarrollo de las bacterias lácticas contribuye favorablemente en las reacciones químicas responsables de su color característico (Herbert, 1993).

Los nitritos son compuestos potencialmente peligrosos, ya que al combinarse con las aminas secundarias pueden dar lugar a la formación de nitrosaminas, por lo que la industria alimentaria tiende a impedir sus niveles residuales en los alimentos empleándolos en las dosis mínimas que permitan el desarrollo del color y su contribución al sabor y al aroma del producto final. Sin embargo, debido a que los nitritos ejercen también una potente actividad antimicrobiana, especialmente frente a *Clostridium botulinum*, la reducción de las dosis empleadas debe ir acompañada de la adición de otras sustancias inhibidoras como, entre otras, los ácidos orgánicos, los peróxidos o las bacteriocinas, que complementen la actividad antibotulínica de los nitritos y que permitan asegurar la calidad higiénica y la seguridad de estos productos.

Finalmente, la actividad peroxidásica o catalásica de las micrococáceas tiene una gran

importancia tecnológica, puesto que controla la presencia de peróxidos en el embutido y, por tanto, evita la peroxidación de la grasa y la decoloración debida a la oxidación del grupo hemo de la mioglobina (Buckenhuskes, 1993).

II.1.4. Las bacterias lácticas como cultivos iniciadores y bioconservantes

Antiguamente los alimentos fermentados se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microflora presente de forma natural en la materia prima (fermentaciones naturales). Hoy en día, las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añaden deliberadamente a la materia prima cultivos de microorganismos específicos, tanto bacterias como hongos y levaduras (cultivos iniciadores), lo que además de importantes repercusiones económicas, permite garantizar y estandarizar las características organolépticas del producto final así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria (Smith y Palumbo, 1981). En este contexto, las bacterias lácticas tienen una gran importancia ya que las actividades metabólicas que desarrollan en los alimentos, y fundamentalmente la producción de ácido láctico con el consiguiente descenso de pH, inducen cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, originando unos productos finales con unas características organolépticas diferentes y deseables (Bacus y Brown, 1981; Smith y Palumbo, 1981, 1983; Haymon, 1982; Lücke, 1986; Daeschel *et al.*, 1987; Hammes *et al.*, 1990; Buckenhuskes, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994a). Las bacterias lácticas, principalmente de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, se emplean habitualmente como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados a partir de la leche (Speck, 1981; Prentice y Neaves, 1986), carne (Bacus y Brown, 1981; Liepe, 1983; Bacus, 1984), diversos productos avícolas (Acton y Dick, 1975) y vegetales (Fleming y McFeeters, 1981; Cooke *et al.*, 1987). Asimismo, se ha propuesto el empleo de cepas del género *Enterococcus*, concretamente de la especie *Enterococcus faecium*, como cultivos iniciadores en el queso *Cheddar* (Battistotti *et al.*, 1977; Tamine, 1990), en el queso *Mozarella* (Parente *et al.*, 1989), en el queso *Tallegio* (Giraffa *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1995) y en los ensilados (Lindgren *et al.*, 1985).

Además de su función tecnológica, las bacterias lácticas secretan numerosos metabolitos (sección II.2.4) que inhiben el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos potencialmente presentes en los alimentos, que incluyen, entre otros, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria*, lo que las convierte en la flora predominante de una gran variedad de productos fermentados y de carnes y pescados conservados en refrigeración y envasados al vacío o en atmósferas modificadas (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996). La seguridad e inocuidad de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos se ha aceptado durante milenios y en la actualidad se consideran microorganismos GRAS (del inglés, *Generally Recognized As Safe*), lo que sugiere su utilización como agentes antimicrobianos naturales (bioconservantes) para incrementar la calidad higiénica y alargar la vida útil de los alimentos (Adams y Marteau, 1995; Gould, 1996; Stiles, 1996). Por otra parte, las bacterias lácticas pueden impedir la acumulación de compuestos tóxicos (ej. aminas biógenas) y cancerígenos (ej. nitrosaminas) en los alimentos (Buckenhuskes, 1993). Así, pues, su empleo y/o el de sus metabolitos como bioconservantes en los alimentos, formando parte de un sistema

de barreras múltiples, está recibiendo una gran atención en los últimos años y sería fácilmente aceptado por los consumidores, que demandan productos naturales, saludables y con menos aditivos químicos, así como por los organismos sanitarios y por las industrias alimentarias de cada país (Wagner y Moberg, 1989; Ray, 1992; Monfort, 1994; Muriana, 1996; McMullen y Stiles, 1996).

II.1.5. Las bacterias lácticas como probióticos

La alteración del equilibrio de la flora microbiana del tracto intestinal del hombre y de los animales puede resultar un serio compromiso para su salud, ya que reduce la capacidad de asimilación de los nutrientes de los alimentos e incrementa la susceptibilidad a padecer determinadas enfermedades. Los probióticos se definen como cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos que se emplean para el consumo humano o animal, en forma de preparados farmacéuticos o a través de los alimentos, con el objeto de proteger y restaurar las condiciones fisiológicas del tracto intestinal (Fuller, 1989). Los microorganismos que tradicionalmente se han utilizado en las preparaciones probióticas incluyen bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* (*Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* y *Lb. helveticus*), *Lactococcus* (*L. lactis* y *L. plantarum*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*) y *Enterococcus* (*E. faecium* y *E. faecalis*) y otros microorganismos como *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*), *Propionibacterium freundereichii* subesp. *shermanii* y *E. coli*. Todos los microorganismos citados son de origen intestinal, a excepción de *S. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* (actualmente, *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*) que se emplean como cultivos iniciadores en la elaboración del yogur (Fuller, 1989; O'Sullivan *et al.*, 1992). En la actualidad se considera que para emplear un microorganismo como probiótico éste ha de cumplir los siguientes requisitos: (i) tolerar las sales biliares y las condiciones extremas de acidez; (ii) adherirse a la mucosa intestinal; (iii) colonizar el tracto intestinal; (iv) inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos, mediante la producción de sustancias antimicrobianas o a través de mecanismos de competición; (v) resultar seguro e inocuo su consumo, tanto formando parte de los alimentos como de los preparados farmacéuticos y, por último, (vi) que se haya aislado de la especie en la que se pretende emplear (Lee y Salminen, 1995; Salminen *et al.*, 1996). Recientes estudios clínicos han demostrado que *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. gasseri* y *E. faecium* colonizan el tracto intestinal y ejercen un papel beneficioso en este ecosistema (Fernandes *et al.*, 1987; Gilliland, 1990; Molin *et al.*, 1993), ya que previenen su colonización por bacterias entéricas patógenas a través de mecanismos de competencia por los nutrientes y por los lugares de adhesión a la pared intestinal (Molin *et al.*, 1993; Bernet *et al.*, 1994; Pedrosa *et al.*, 1995; Casas *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha observado que algunas de las bacterias lácticas empleadas o propuestas recientemente como probióticos ejercen otros efectos terapéuticos y nutricionales, entre los que se incluyen: (i) reducción de los niveles de colesterol en la sangre, ya que modulan la proporción entre las lipoproteínas de alta y baja densidad asociadas a su transporte y/o asimilan e hidrolizan las sales biliares; (ii) disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, ya que reducen la actividad de diversos enzimas fecales (ej. β -glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa) que pueden convertir en carcinógenos los compuestos procarcinogénicos presentes en el colon, inactivan compuestos cancerígenos de los alimentos (ej. nitritos), producen sustancias como el butirato o

ácido butírico que retardan el crecimiento de los cultivos celulares con tumores de colon, e hidrolizan factores antinutricionales (ej. ácido fítico y glucosinolatos); (iii) supresión de ciertos tumores por estimulación inespecífica del sistema inmune mediante la producción de macrófagos; (iv) modulación de la respuesta inmune mediante la activación de linfocitos, el aumento de los niveles de inmunoglobulina A y la estimulación de la producción de interferón; (v) incremento del valor nutritivo de los alimentos y, por último, (vi) aumento de la tolerancia a la lactosa (Platt, 1964; Fernandes *et al.*, 1987; Gurr, 1987; Fuller, 1989; Fernandes y Shahani, 1990; Gilliland, 1990; 1990; Hosoda *et al.*, 1992; Lee y Salminen, 1995; Salminen *et al.*, 1996).

II.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

El concepto de bacterias lácticas como un grupo de microorganismos surgió a principios del siglo XX, precedido de los enormes avances tecnológicos y conocimientos científicos generados durante la última parte del siglo XIX. Las interacciones establecidas entre las bacterias lácticas y los alimentos llamaron pronto la atención de los científicos, lo que resultó en la significativa contribución de Pasteur, quien en 1857 demostró que los procesos fermentativos iban acompañados invariablemente del desarrollo de microorganismos y, asimismo, que cada tipo de fermentación, definido en función de sus principales productos orgánicos finales (ej. la fermentación láctica, alcohólica o butírica), estaba asociado a un tipo específico de microorganismo. Posteriormente, Lister, en 1873, aisló el primer cultivo puro de un microorganismo y lo denominó *Bacterium lactis*. En 1884, Hueppe describió por primera vez la microflora responsable de la acidificación y coagulación de la leche y productos lácteos, denominándola “*Milchsauerbacillus*”, y Weigmann (1899) propuso el término “*Bacterium acidilactici*” para estos microorganismos. Simultáneamente, este investigador introdujo el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de quesos y de leche agria en las industrias alimentarias de las ciudades de Kiel y Storch (Copenhague), lo que representó el comienzo de la era industrial de las fermentaciones como procesos controlados o dirigidos. A principios del siglo XX, el empleo de los lactobacilos en la dieta humana cobró un enorme interés, a raíz de la propuesta de Elie Metchnikoff del Instituto Pasteur de París de promover su utilización en la dieta como agentes bacterioprofilácticos y bacterioterapéuticos (Bibel, 1988); no obstante, sus teorías acerca de la salud y longevidad asociadas al consumo de los lactobacilos se desacreditaron debido a la falta de una base científica sólida y a unas expectativas desmesuradas de los consumidores.

La fuente originaria de las bacterias lácticas son las plantas verdes, si bien, por un proceso de evolución y adaptación biológica han ido colonizando otros ambientes y actualmente se localizan en diversos habitats, siempre que éstos reúnan las condiciones adecuadas para satisfacer sus necesidades nutritivas. Algunas bacterias lácticas viven en asociación con las plantas y crecen a expensas de los nutrientes liberados tras la muerte y descomposición de los tejidos vegetales, por lo que también se encuentran en alimentos y bebidas preparadas a partir de materiales vegetales, tales como los encurtidos, la col ácida, el pienso, los ensilados, los productos de panadería, el vino, la cerveza y los zumos naturales. Un segundo habitat característico de las bacterias lácticas es la leche, a la que acceden a través del cuerpo de la vaca, el estiércol o los vegetales, por lo que estos microorganismos también se encuentran asociados a diversos productos lácteos fermentados. Otras bacterias lácticas constituyen parte de la biota

normal del cuerpo animal y se encuentran en el tracto gastrointestinal y mucosas, por lo que también están asociadas a la carne y a los productos cárnicos. Finalmente, algunas bacterias lácticas han sido aisladas del pescado, del estiércol y de las aguas residuales.

II.2.1. Características generales y consideraciones taxonómicas y filogenéticas de las bacterias lácticas

Tradicionalmente, el término bacterias lácticas se ha empleado para denominar a un grupo de microorganismos con una gran diversidad morfológica y fisiológica, cuya característica principal es la producción de ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de hidratos de carbono (al menos un 50%) (Orla-Jensen, 1919; Sharpe, 1979). Originariamente, este grupo incluía bacterias Gram-positivas de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar; inmóviles y no esporuladas; microaerofílicas o anaerobias facultativas; incapaces de sintetizar citocromos y catalasa-negativas; acidúricas o acidófilas y no reductoras de nitratos.

Los primeros intentos de clasificar taxonómicamente las bacterias lácticas se deben a Orla-Jensen (1919), quien, basándose en la morfología y la disposición celular y en criterios fisiológicos tales como el tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, el tipo de isómero del ácido láctico producido y la capacidad de desarrollarse a 10 y a 45°C, las clasificó en los géneros *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Microbacterium*, de morfología bacilar, y *Streptococcus*, *Betacoccus* y *Tetracoccus*, de morfología cocoide (Tabla II.1). Orla-Jensen clasificó la cepa bacilar aislada por el científico Elie Metchnikoff del yogur búlgaro como *Thermobacterium bulgaricum* (Bibel, 1988). Las especies de los géneros *Betabacterium* y *Betacoccus*, de morfología bacilar y cocoide, respectivamente, son heterofermentativas, mientras que las que constituyen el resto de los géneros se caracterizan por su metabolismo homofermentativo. Posteriormente, en la clasificación taxonómica de la 8ª edición del “*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*” (Buchanan y Gibbons, 1974) estos microorganismos se agruparon, atendiendo fundamentalmente a criterios morfológicos, en dos familias: (i) *Lactobacillaceae*, constituida por el género *Lactobacillus*, que englobaba a los géneros *Betabacterium*, *Thermobacterium* y *Streptobacterium* de Orla-Jensen, así como a otros géneros de filiación taxonómica incierta y (ii) *Streptococcaceae*, formada por los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Gemella*. Los géneros *Pediococcus* y *Leuconostoc* englobaban, respectivamente, a los géneros *Tetracoccus* y *Betacoccus* de Orla-Jensen.

En la última edición del “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*” (1986), las bacterias Gram-positivas de morfología cocoide o bacilar, no esporuladas, anaerobias facultativas, catalasa-negativas y productoras de ácido láctico tras la fermentación de la glucosa se clasificaron en los géneros *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Gemella*. El género *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986) incluía 45 especies, distribuidas en tres grupos dependiendo de la presencia o ausencia de fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfocetolasa, enzimas claves del metabolismo homo y heterofermentativo de los azúcares, respectivamente. El grupo I comprendía a los lactobacilos homofermentativos obligados, el grupo II a los lactobacilos heterofermentativos facultativos y el grupo III a los lactobacilos heterofermentativos obligados. Los grupos I, II y III englobaban, respectivamente, los géneros *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium* de Orla-Jensen, así como otras

Tabla II.1. Clasificación de las bacterias lácticas atendiendo a los criterios establecidos por Orla-Jensen (1919) y correspondencia con la clasificación taxonómica actual

| Género ^a | Morfología | Reacción catalasa | Fermentación de la glucosa | Género actual |
|-------------------------|------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Betabacterium</i> | bacilar | negativa | heterofermentativa | <i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i> |
| <i>Thermobacterium</i> | bacilar | negativa | homofermentativa | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Streptobacterium</i> | bacilar | negativa | homofermentativa | <i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i> |
| <i>Streptococcus</i> | cocoide | negativa | homofermentativa | <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i> <i>Enterococcus</i> |
| <i>Betacoccus</i> | cocoide | negativa | heterofermentativa | <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i> |
| <i>Microbacterium</i> | bacilar | positiva | homofermentativa | <i>Brochothrix</i> |
| <i>Tetracoccus</i> | cocoide | positiva ^b | homofermentativa | <i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i> |

^aDenominación genérica atendiendo a los criterios de Orla-Jensen (1919).

^bLos pediococos son generalmente catalasa-negativos; no obstante, algunas especies producen pseudocatalasa.

Fuente: Stiles y Holzapfel (1997).

especies de reciente identificación. El género *Erysipelothrix* (Jones, 1986) era monoespecífico. El género *Streptococcus* (Hardie, 1986; Mundt, 1986) englobaba un total de 30 especies distribuidas en 6 grupos: estreptococos piógenos, estreptococos orales, estreptococos anaeróbicos, estreptococos lácticos, otros estreptococos y enterococos. En la revisión del género realizada por Mundt (1986) se consideraba a los enterococos como grupo pero no se reconocían como género, si bien ya se anticipaba esta posibilidad (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Collins *et al.*, 1984a). Los géneros *Pediococcus* (Garvie, 1986) y *Leuconostoc* (Garvie, 1986) comprendían un total de 8 y 4 especies, respectivamente, mientras que los géneros *Aerococcus* (Evans, 1986) y *Gemella* (Reyn, 1986) eran monoespecíficos.

En los últimos años, el desarrollo y la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares sofisticadas como la determinación de la composición de bases guanina y citosina del ADN (mol% G+C), la hibridación química de los ácidos nucleicos (ADN:ADN y ADN:ARN) y su secuenciación ha originado cambios en la taxonomía de las bacterias lácticas, la mayoría de los cuales aparecen reflejados en la 9ª edición del "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*" (Holt *et al.*, 1994). Atendiendo a la secuenciación del ARNr 16S y a estudios de hibridación ADN-ARNr (Garvie y Farrow, 1981; Kilpper-Bälz y Schleifer, 1981, 1984; Kilpper-Bälz *et al.*, 1982; Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer *et al.*, 1985), así como a diversos estudios serológicos con antisueros de la superóxido dismutasa (Schleifer *et al.*, 1985), el género *Streptococcus* se dividió en tres géneros filogenéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Posteriormente, Schleifer y Kilpper-Bälz (1987) realizaron estudios basados además en pruebas serológicas, en la composición de bases del ADN y en la composición química de la pared bacteriana, que confirmaron esta división.

El género *Streptococcus sensu stricto* comprende la mayoría de los estreptococos incluidos en la última edición del "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (1986) en los grupos piógenos, orales y "otros" estreptococos, así como a diversas especies de reciente identificación y quedan excluidos del género los estreptococos anaeróbicos (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987). De los estreptococos, la única especie de interés en la industria alimentaria es *S. thermophilus*, que junto a *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, se emplea como cultivo iniciador en la elaboración del yogur y en algunos tipos de quesos.

El género *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1985) engloba a los estreptococos lácticos o del grupo N de Lancefield (Jones, 1978), representados por *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, en adelante *L. lactis* (incluye las especies denominadas anteriormente *S. lactis* subesp. *lactis*, *S. lactis* subesp. *diacetylactis* y *Lb. xilosus*) y *L. lactis* subesp. *cremoris*, en adelante *L. cremoris*. Además, se incluye *L. lactis* subesp. *hordniae* (anteriormente *Lb. hordniae*), en adelante *L. hordniae*, a *L. raffinolactis* (antiguamente *S. raffinolactis*), *L. garviae* y *L. plantarum*, dos nuevas especies de estreptococos con el antígeno N descritas por Collins *et al.* (1983), y la especie de reciente identificación *L. piscium* (Williams *et al.*, 1990).

El género *Enterococcus* está formado por los denominados antiguamente estreptococos fecales o del grupo D de Lancefield (Jones, 1987), a excepción de *S. bovis* y *S. equinus*, junto a diversas especies de reciente identificación (Devriese *et al.*, 1993).

Por otra parte, los estreptococos móviles del grupo N de Lancefield, incluidos previamente en el género *Lactococcus*, han pasado a constituir el género *Vagococcus*, con *Vagococcus*

fluviales (*V. fluviales*) como cepa tipo (Collins *et al.*, 1989a). Posteriormente, algunos lactobacilos atípicos aislados de salmón se han identificado como *V. salmoninarum* (Wallbanks *et al.*, 1990).

En cuanto al género *Lactobacillus*, las especies *Lb. piscicola*, *Lb. divergens* y *Lb. carnis*, anteriormente clasificadas en el grupo III, han pasado a formar el género *Carnobacterium*, que actualmente comprende también las nuevas especies *Carnobacterium gallinarum* (*C. gallinarum*), *C. mobile*, *C. funditum* y *C. alterfunditum* (Collins *et al.*, 1987a; Wallbanks *et al.*, 1990; Franzmann *et al.*, 1991). Collins *et al.* (1991a) sugieren el nombre de *C. maltaromicus* (antiguamente, *Lb. maltaromicus*) como sinónimo de *C. piscicola*.

Respecto al género *Pediococcus*, la especie *P. urinaeequi* se ha transferido al género *Aerococcus* (*A. urinaeequi*) y la especie *P. halophilus* ha pasado a constituir un nuevo género denominado *Tetragenococcus* (*T. halophilus*) (Collins *et al.*, 1990a). Así pues, el género *Pediococcus* queda constituido por las siguientes especies: *P. acidilactici* (incluye la mayoría de las cepas de la especie denominada antiguamente *P. cerevisiae*), *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. dextranicus*, *P. inopinatus* y *P. parvulus*.

Finalmente, el género *Leuconostoc* esta constituido por las 4 especies que se incluyen en la última edición del “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*” (1986) (*Lc. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lc. paramesenteroides* y *Lc. oenos*) y por 6 especies más de reciente identificación (*Lc. gelidum*, *Lc. carnosum*, *Lc. amelobiosum*, *Lc. citreum*, *Lc. pseudomesenteroides* y *Lc. fallax*) (Martínez-Murcia *et al.*, 1991a; Pot *et al.*, 1994b).

Considerando como características definitorias de las bacterias lácticas la respuesta positiva a la tinción de Gram, la incapacidad de esporular, el carácter microaerofílico o anaerobio facultativo, la ausencia de citocromos y catalasa *sensu stricto*, la producción de ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de hidratos de carbono (al menos un 50%), un contenido G+C inferior a 55 mol% y una estrecha relación con los alimentos, en este trabajo se considerará, al igual que en la mayoría de las revisiones taxonómicas que aparecen en la bibliografía, que el grupo de las bacterias lácticas está constituido por los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Tabla II.3).

Atendiendo al tipo de metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono las bacterias lácticas se agrupan en tres categorías: homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas (Axelsson, 1993). Las bacterias lácticas homofermentativas obligadas (*Lactobacillus* del grupo I) degradan la glucosa y otras hexosas casi exclusivamente a ácido láctico, a través de la ruta de Embden-Meyerhof, mediante la participación del enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa. Estos microorganismos carecen de los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa y no son capaces de fermentar las pentosas ni el gluconato. Las bacterias lácticas heterofermentativas obligadas (*Leuconostoc* y *Lactobacillus* del grupo III) catabolizan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético o etanol y las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético, a través de la ruta de las pentosas fosfato mediante la intervención del enzima fosfocetolasa. Estos microorganismos carecen del enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa. El resto de las bacterias lácticas (*Lactobacillus* del grupo II, *Carnobacterium*, *Lactococcus*,

Vagococcus, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*) fermentan las hexosas, al igual que las bacterias lácticas homofermentativas obligadas, casi exclusivamente a ácido láctico a través de la ruta de Embden-Meyerhof; no obstante, algunos de estos microorganismos a pesar de carecer del enzima fosfocetolasa, en condiciones limitantes de hidratos de carbono o de anaerobiosis producen además ácido fórmico, ácido acético y etanol (Cogan *et al.*, 1989). En lo que respecta a la utilización de las pentosas, la mayoría de estos microorganismos son capaces de fermentarlas por acción de una fosfocetolasa inducible, produciendo cantidades equimolares de ácido láctico y acetato (Kandler, 1983). El hecho de que estos microorganismos presenten un perfil homofermentativo, en lo que respecta al metabolismo de las hexosas, y heterofermentativo, en lo que concierne al metabolismo de las pentosas y otros sustratos (ej. gluconato), sugiere su denominación como bacterias lácticas heterofermentativas facultativas (Kandler, 1983; Kandler y Weiss, 1986; Axelsson, 1993). Por otra parte, las bacterias lácticas pueden utilizar como fuente de carbono diversos disacáridos como, entre otros, la lactosa y la sacarosa. Estos azúcares se internan en la célula a través de un sistema permeasa dependiente de ATP o del sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (sistema PEP-PTS) y son hidrolizados a sus correspondientes monosacáridos; posteriormente, éstos son degradados a ácido láctico y a otros metabolitos a través de alguna de las rutas metabólicas citadas anteriormente (Kandler, 1983).

II.2.1.1. Consideraciones filogenéticas de las bacterias lácticas

Atendiendo a la composición del ADN (mol% G+C), las eubacterias Gram-positivas se dividen en dos grupos denominados actinomicete y clostridial. El grupo actinomicete, o de elevado G+C, está compuesto por bacterias con un contenido G+C superior a 55 mol%, entre las que se incluyen los géneros *Bifidobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* y *Streptomyces* (Woese, 1987; Stackebrandt y Teuber, 1988). Por otra parte, el grupo clostridial, o de bajo contenido G+C, está compuesto por bacterias con un contenido G+C inferior a 55 mol% e incluye a todos los géneros que componen el grupo de las bacterias lácticas junto a otros microorganismos aerobios y anaerobios facultativos de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Listeria* y microorganismos anaerobios de los géneros *Clostridium*, *Peptococcus* y *Ruminococcus*, entre otros (Woese, 1987; Stackebrandt y Teuber, 1988).

Estudios de secuenciación del ARNr 16S, realizados empleando la transcriptasa inversa, han permitido estudiar en profundidad las relaciones filogenéticas existentes entre las bacterias lácticas, poniendo de manifiesto su discordancia con la clasificación taxonómica establecida actualmente, concretamente en el caso de los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Collins *et al.*, 1989a; 1991a; Yang y Woese, 1989; Martínez-Murcia y Collins, 1990; 1991a; Wallbanks *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1993).

En el árbol filogenético propuesto para las bacterias lácticas (Axelson, 1993) (Figura 2.1) se observa que los géneros *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Streptococcus*, constituyen una verdadera unidad filogenética o supergrupo, dentro de la cual las relaciones filogenéticas mas estrechas se establecen entre los géneros *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium* y *Tetragenococcus*. Estos microorganismos están

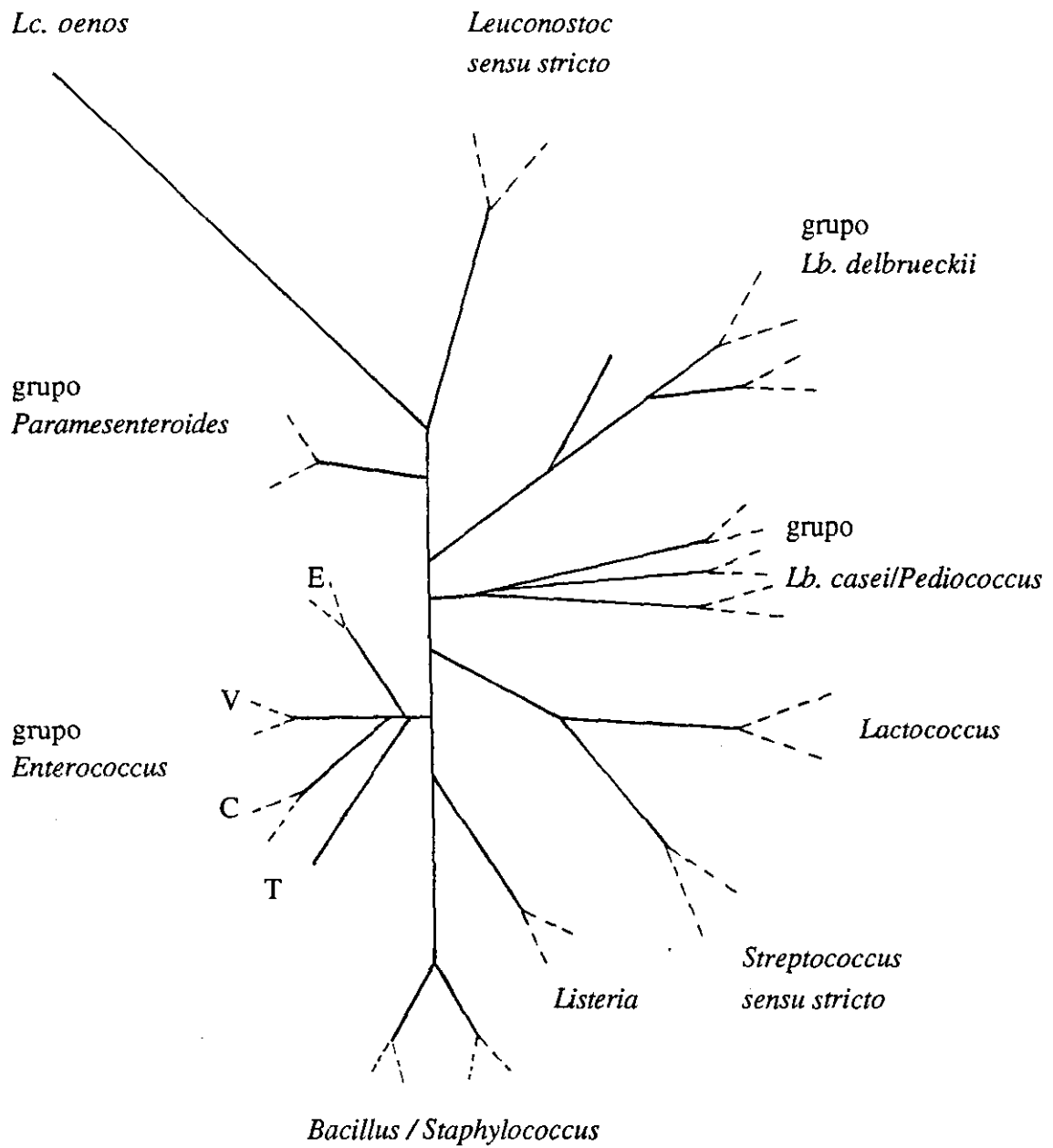


Figura 2.1. Arbol filogenético de las bacterias lácticas. Las distancias evolutivas son aproximadas.

Abreviaturas: E, *Enterococcus*; V, *Vagococcus*; C, *Carnobacterium*; T, *Tetragenococcus*. Fuente: Collins *et al.* (1989, 1990, 1991); Martínez-Murcia y Collins (1990); Wallbanks *et al.* (1990) y Williams *et al.* (1991).

filogenéticamente más próximos a los del género *Listeria*, o incluso *Bacillus*, que al resto de las bacterias lácticas. Asimismo, los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* están también más relacionados entre sí, que con el resto de las bacterias lácticas. Sin embargo, los grupos que se originan atendiendo a las relaciones evolutivas de los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* no se corresponden con los establecidos taxonómicamente. Las bacterias lácticas del género *Leuconostoc* (grupo *Leuconostoc*) se escinden en tres grupos con categoría de género: (i) grupo *Leuconostoc sensu stricto* o *mesenteroides*, que contiene la mayoría de las especies de leuconostoc (*Lc. mesenteroides*, *Lc. pseudomesenteroides*, *Lc. lactis*, *Lc. citreum* (sinónimo de *Lc. amelibiosum*), *Lc. gelidum*, *Lc. carnosum*, *Lc. fallax* y *Lc. argentinum*) y la especie *Lb. fructosus* y que constituirían el género *Leuconostoc sensu stricto* (Yang y Woese, 1989; Martínez-Murcia y Collins, 1990; 1991a; Collins *et al.*, 1991a; Dicks *et al.*, 1993), (ii) grupo *paramesenteroides*, integrado por la especie *Lc. paramesenteroides* y por algunas de las especies heterofermentativas del género *Lactobacillus* que contienen puentes interpeptídicos inusuales en el peptidoglicano de la pared celular (*Lb. confusus*, *Lb. halotolerans*, *Lb. kandleri*, *Lb. minor* y *Lb. viridescens*) y que, junto a la especie de reciente identificación *Weissella hellenica*, aislada de embutidos crudos curados, conformarían el género *Weissella* (Collins *et al.*, 1993; Stiles y Holzapfel, 1997) y, (iii) grupo *Leuconostoc oenos*, con la especie *Lc. oenos* (más correctamente, *Lc. oeni*), que constituiría el género *Oenococcus* (Dicks *et al.*, 1995). Este microorganismo constituye un claro ejemplo de adaptación evolutiva y divergente, que ha dado lugar a que en la actualidad se encuentre alejado filogenéticamente de las otras bacterias Gram-positivas. Las restantes especies del género *Lactobacillus* se escinden en dos grupos: (i) grupo *Lb. delbrueckii*, que incluye la mayoría de los lactobacilos homofermentativos obligados (grupo I) y dos especies de lactobacilos heterofermentativos facultativos (grupo II) y (ii) grupo *Lb. casei-Pediococcus*, que comprende el resto de lactobacilos (grupos I, II y III) y las 6 especies de *Pediococcus* mencionadas anteriormente (Collins *et al.*, 1991a). Este último grupo constituye una unidad de gran cohesión filogenética, con la especie *P. dextrinicus* como miembro periférico (Collins *et al.*, 1990a). En la Tabla II.2 se muestra la subdivisión de las principales especies incluidas tradicionalmente en los géneros *Lactobacillus* (grupos I, II y III), *Leuconostoc* y *Pediococcus* atendiendo a sus relaciones filogenéticas y al tipo de metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono.

Las principales conclusiones que se obtienen de los estudios sobre las relaciones filogenéticas de las bacterias lácticas son las siguientes: (i) la morfología celular es un criterio de escasa validez para establecer relaciones filogenéticas, como se demuestra en el caso de la estructura filogenética de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* y (ii) se requieren revisiones taxonómicas adicionales, si bien, aún no existe un consenso sobre los criterios a establecer. A este respecto, Woese (1987) señaló que debe haber alguna correlación entre la posición filogenética y el fenotipo de una determinada especie o cepa bacteriana, si bien, resulta difícil seleccionar la(s) característica(s) que se tendrían que emplear para establecer estas correlaciones de forma correcta. Vandamme *et al.*, (1996) publicaron un excelente trabajo de taxonomía polifásica bacteriana en el que se incluye el grupo de las bacterias lácticas y, concretamente, se enumeran y se describen diversas características de las especies pertenecientes a los grupos *Lb. delbrueckii* y *Lb. casei-Pediococcus* y a los grupos *Leuconostoc sensu stricto* o *mesenteroides*,

Tabla II.2. Subdivisión de las principales especies incluidas tradicionalmente en los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* atendiendo a sus relaciones filogenéticas y al tipo de metabolismo fermentativo

| Grupos establecidos según el tipo de metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupos filogenéticos | I. Homofermentativos obligados | II. Heterofermentativos facultativos | III. Heterofermentativos obligados |
| <i>Lb. delbrueckii</i> | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>delbrueckii</i> , subesp. <i>bulgaricus</i> y subesp. <i>lactis</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefirgranum</i> | <i>Lb. acetotolerans</i> , <i>Lb. hamsteri</i> | |
| <i>Lb. casei</i> - <i>Pediococcus</i> | <i>Lb. aviarus</i> subesp. <i>araffinosus</i> y subesp. <i>aviarus</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. ruminis</i> , <i>Lb. salivarius</i> subesp. <i>salicinus</i> y subesp. <i>salivarius</i> , <i>Lb. sharpae</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. parvulus</i> | <i>Lb. agilis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. bifermentans</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. coryniformis</i> subesp. <i>coryniformis</i> y subesp. <i>torquens</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. homiochii</i> , <i>Lb. intestinalis</i> , <i>Lb. murinus</i> , <i>Lb. paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> y subesp. <i>tolerans</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sake</i> (<i>Lb. bavaricus</i>); <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> | <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. collinoides</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. malefermentans</i> , <i>Lb. oris</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. parakefir</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Lb. suebicus</i> , <i>Lb. vaccinostercus</i> |
| <i>Leuconostoc</i> | | | <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>Lc. pseudomesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. citreum</i> (<i>Lc. amelobiosum</i>), <i>Lc. gelidum</i> , <i>Lc. carnosum</i> , <i>Lc. fructosus</i> (<i>Lb. fructosus</i>), <i>Lc. argentinum</i> , <i>Lc. fallax</i> ; <i>W. paramesenteroides</i> , (<i>Lc. paramesenteroides</i>), <i>W. confusus</i> (<i>Lb. confusus</i>) <i>W. halotolerans</i> (<i>Lb. halotolerans</i>), <i>W. kandleri</i> (<i>Lb. kandleri</i>), <i>W. minor</i> (<i>Lb. minor</i>), <i>W. viridescens</i> (<i>Lb. viridescens</i>), <i>W. hellenica</i> ; <i>O. oeni</i> (<i>Lc. oenus</i>) |
| Otros lactobacilos ^a | <i>Lb. divergens</i> (<i>C. divergens</i>), <i>Lb. carnis</i> (<i>C. carnis</i>), <i>Lb. piscicola</i> y <i>Lb. maltaromicus</i> (<i>Cb. piscicola</i>), <i>Lb. hordniae</i> y <i>Lb. xylosus</i> (<i>L. lactis</i>) | | |

^aLas especies de este grupo se han excluido del género *Lactobacillus*. Fuente: Vandamme *et al.* (1996) y Stiles y Holzapfel (1997).

paramesenteroides y *Leuconostoc oenos*. Recientemente, Stiles y Holzapfel (1997) han realizado una revisión taxonómica del grupo de las bacterias lácticas asociadas con los alimentos, en la cual se incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* y se establece su relación con los géneros descritos inicialmente por Orla-Jensen (1919) (Tabla II.1).

II.2.2. Diferenciación de las bacterias lácticas a nivel de género y especie

Los criterios empleados por Orla-Jensen en 1919 para establecer la primera clasificación de las bacterias lácticas continúan actualmente siendo de gran utilidad, desde un punto de vista práctico, para su clasificación a nivel de género. En la Tabla II.3 se muestran las principales características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que permiten diferenciar los géneros de las bacterias lácticas (Axelsson, 1993). Atendiendo a la morfología celular, las bacterias lácticas se dividen en bacilos (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*) y cocos (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*). Asimismo, la división celular alternativamente en dos direcciones perpendiculares dentro de un mismo plano, dando como resultado la formación de tétradas, es característica de los géneros *Pediococcus* y *Tetragenococcus*. El crecimiento a 10 y a 45°C es una característica útil para diferenciar algunas de las bacterias lácticas de morfología cocoide. Así, pues, los enterococos crecen a 10 y a 45°C, los lactococos y los vagococos crecen a 10 pero no a 45°C y los estreptococos no crecen a 10°C y sólo algunas especies lo hacen a 45°C. Por otra parte, la capacidad de desarrollarse en presencia de un 6,5% de NaCl permite diferenciar el género *Enterococcus* de los géneros *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Streptococcus*, si bien, en el caso de este último género se han descrito respuestas variables dependiendo de la especie (Mundt, 1986). Asimismo, el género *Tetragenococcus* es extremadamente halotolerante, siendo el único capaz de desarrollarse en presencia de un 18% de NaCl. Otra característica diferenciadora es la tolerancia a valores de pH ácidos (pH 4,4) y básicos (pH 9,6). A este respecto, los enterococos son los únicos capaces de desarrollarse a pH 4,4 y a pH 9,6, mientras que los estreptococos no crecen a ninguno de estos valores. Los lactococos y vagococos no se desarrollan a pH 9,6 y sólo algunas especies crecen a pH 4,4. Otra característica importante para la diferenciación de las bacterias lácticas es el tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa. Bajo condiciones de incubación estándar (ej. concentración no limitante de glucosa y de factores de crecimiento y disponibilidad limitada de oxígeno) las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico como metabolito final mayoritario y las bacterias lácticas heterofermentativas estrictas producen cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético/etanol y CO₂ (Sharpe, 1979). Así, pues, la detección de la producción de CO₂ a partir de la glucosa es una prueba rápida que permite distinguir el tipo de metabolismo fermentativo de dicho azúcar. Las especies del género *Leuconostoc* y algunos lactobacilos son heterofermentativos estrictos, mientras que el resto de las bacterias lácticas son homofermentativas. Por otra parte, las bacterias lácticas se diferencian por los isómeros del ácido láctico que producen (D-ácido láctico y/o L-ácido láctico), lo que a su vez está determinado por la estereoespecificidad de los enzimas lactato deshidrogenasa NAD⁺ dependientes, L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) y D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), que llevan a cabo la reducción

Tabla II.3. Diferenciación morfológica, fisiológica y bioquímica de las bacterias lácticas a nivel de género

| Característica | Bacilos | | Cocos | | | | | |
|--------------------------------------------|-----------------------|----------------|------------------|---------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| | <i>Lactob.</i> | <i>Carnob.</i> | <i>Lactoc.</i> | | | | | |
| | | | <i>Streptoc.</i> | <i>Vagoc.</i> | <i>Enteroc.</i> | <i>Leucon.</i> | <i>Pedioc.</i> | <i>Tetragenoc.</i> |
| Formación de tétradas | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Producción de CO ₂ ^a | ± | - | - | - | - | + | - | - |
| Crecimiento a: | | | | | | | | |
| 10°C | ± | + | - | + | + | + | ± | + |
| 45°C | ± | - | ± | - | + | - | ± | - |
| pH 4,4 | ± | ND | - | ± | + | ± | + | - |
| pH 9,6 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Crecimiento en : | | | | | | | | |
| 6,5% NaCl | ± | ND | - | - | + | ± | ± | + |
| 18% NaCl | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Isómero del lactato | D, L, DL ^b | L | L | L | L | D | L, DL ^b | L |

Abreviaturas: *Lactob.*, *Lactobacillus*; *Carnob.*, *Carnobacterium*; *Streptoc.*, *Streptococcus*; *Lactoc.*, *Lactococcus*; *Vagoc.*, *Vagococcus*; *Enteroc.*, *Enterococcus*; *Leucon.*, *Leuconostoc*; *Pedioc.*, *Pediococcus*; *Tetragenoc.*, *Tetragenococcus*.

Símbolos: +, respuesta positiva; -, respuesta negativa; ±, respuesta variable según la especie; ND, no determinado.

^aProducción de CO₂ a partir de la fermentación de la glucosa: +, metabolismo heterofermentativo; -, metabolismo homofermentativo.

^bEl tipo de isómero producido (D-, L- o DL-lactato) es variable dependiendo de la especie.

Fuente: Axelsson (1993).

del piruvato. Esta característica puede ser útil para diferenciar las especies del género *Leuconostoc* de la mayoría de los lactobacilos heterofermentativos, ya que las primeras producen únicamente D-ácido láctico y los segundos forman ácido láctico racémico (DL-ácido láctico), gracias a la presencia de una racemasa que efectúa la conversión entre los dos isómeros.

Como se observa en la Tabla II.3, las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas anteriormente no permiten diferenciar los géneros *Carnobacterium* y *Lactobacillus* ni los géneros *Lactococcus* y *Vagococcus*. No obstante, el desarrollo en agar acetato permite diferenciar los géneros *Carnobacterium* y *Lactobacillus*, debido a la incapacidad de los primeros de desarrollarse en dicho medio a pH 5,6 (Hammes *et al.*, 1992). Por otra parte, los vagococos y las carnobacterias presentan una composición de ácidos grasos muy particular, lo cual permite distinguirlos de los otros géneros de las bacterias lácticas. Asimismo, la mayoría de las especies del género *Carnobacterium* son móviles, lo cual es una característica poco común entre el resto de las bacterias lácticas (Collins *et al.*, 1987a; 1989a).

La descripción detallada de las características que permiten diferenciar las bacterias lácticas a nivel de especie, así como la enumeración de las especies que se incluyen en cada género resultaría impropio en este trabajo; no obstante, a continuación se citan las principales pruebas y técnicas empleadas para su identificación (Stahl *et al.*, 1990; Pot *et al.*, 1994b; Vandamme *et al.*, 1996). En determinadas ocasiones, algunas de las pruebas fisiológicas y bioquímicas mencionadas anteriormente pueden resultar también útiles para la diferenciación de las bacterias lácticas a nivel de especie; no obstante, para su correcta caracterización se requiere siempre la realización de pruebas adicionales, entre las que se incluyen: (i) la determinación del patrón de fermentación de hidratos de carbono; (ii) la hidrólisis de la arginina; (iii) la producción de acetoina (prueba de Voges-Proskauer); (iv) la tolerancia a la bilis; (v) la actividad hemolítica y el tipo de hemólisis; (vi) los requerimientos de factores de crecimiento; (vii) la producción de polisacáridos extracelulares; (viii) las características de crecimiento en la leche; (ix) la presencia de ciertas enzimas (ej. β -galactosidasa y β -glucuronidasa) y (x) los ensayos serológicos. Otras técnicas quimiotaxonómicas y moleculares empleadas incluyen: (i) el análisis de la composición de la pared celular para determinar la presencia de ácido diaminopimélico, el tipo de peptidoglicano y la presencia y tipo de ácidos teicoicos; (ii) la movilidad electroforética de las lactato dehidrogenasas; (iii) el tipo de quinonas isoprenoides y de ácidos grasos de las membranas citoplásmicas; (iv) la estructura y las relaciones inmunológicas de algunas enzimas (ej. dehidrogenasas) y (v) el patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliácridamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). En cuanto a las técnicas moleculares a nivel de los ácidos nucleicos se incluyen: (i) el contenido mol% G+C del ADN, (ii) el análisis de los fragmentos de restricción del ADN genómico o plasmídico, (iii) la hibridación de los ácidos nucleicos (ADN:ADN y ADN:ARNr) y (iv) la secuenciación del ARNr 16S y 23S para, posteriormente, realizar un análisis comparativo de sus secuencias. Finalmente, otras técnicas mencionadas en la literatura consultada incluyen: (i) el empleo de anticuerpos monoclonales (Hammonds *et al.*, 1992) y (ii) el estudio comparativo de los patrones de actividad bacteriolítica (Pompei *et al.*, 1992a).

II.2.3. Bacterias lácticas del género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* (Thiercelin y Jouhaud, 1903; Kalina, 1970) fue propuesto nuevamente por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984), con objeto de acomodar taxonómicamente las especies *S. faecalis* (actualmente *E. faecalis*) y *S. faecium* (actualmente *E. faecium*) asociadas tradicionalmente a otros estreptococos del grupo D de Lancefield como una subdivisión del género *Streptococcus* (Sherman, 1937; Jones, 1978). Diversos estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos realizados ese mismo año justificaron la transferencia al género *Enterococcus* de otras especies de estreptococos del grupo D de Lancefield, como *S. avium* (*E. avium*), *S. gallinarum* (*E. gallinarum*), *S. faecium* subesp. *casseliflavus* (*E. casseliflavus*), *S. faecalis* variedad *malodoratus* (*E. malodoratus*), *S. durans* (*E. durans*) (Collins *et al.*, 1984a) y *S. saccharolyticus* (*E. saccharolyticus*) (Rodrigues y Collins, 1990), así como de la especie *S. cecorum* (*E. cecorum*), un estreptococo que no presenta el antígeno D de Lancefield (Williams *et al.* 1989). Posteriormente, 9 nuevas especies de enterococos han sido descritas: *E. hirae* (Farrow y Collins, 1985), *E. mundtii* (Collins *et al.*, 1986a), *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* (Collins *et al.*, 1989b), *E. columbae* (Devriese *et al.*, 1990), *E. dispar* (Collins *et al.*, 1991b), *E. sulfureus* (Martínez-Murcia y Collins, 1991b) y *E. flavescens* (Pompei *et al.*, 1992b). En 1991, Kusuda *et al.* propusieron la inclusión de *E. seriolicida* en el género, sin embargo, recientes estudios taxonómicos sugieren su identidad con *Lc. garviea* (Teixeira *et al.*, 1996). Asimismo, diversos estudios filogenéticos han revelado que *E. solitarius* está más relacionado con el género *Tetragenococcus* que con el género *Enterococcus* (Collins *et al.*, 1990a; Williams *et al.*, 1991). Por otra parte, es interesante destacar que las especies *S. bovis* y *S. equinus*, tradicionalmente asociadas con los enterococos por compartir los mismos habitats y presentar el antígeno D de Lancefield, se incluyen actualmente en el género *Streptococcus sensu stricto* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987).

Recientemente, estudios comparativos de las secuencias de la subunidad 16S del ARNr de la mayoría de las especies que constituyen el género *Enterococcus* han permitido su clasificación en los siguientes grupos: grupo I, o grupo *E. faecium*, constituido por *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* y *E. mundtii*, con una similitud entre las secuencias del ARNr 16S del 98,7-99,7%; grupo II, o grupo *E. avium*, integrado por las especies *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* y *E. pseudoavium*, con una similitud de las secuencias del ARNr 16S entre el 99,3 y 99,7%; y grupo III, o grupo *E. gallinarum*, formado por *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, cuyas secuencias del ARNr 16S muestran una homología del 99,8% (Williams *et al.*, 1991). El resto de las especies del género, incluyendo la especie tipo *E. faecalis*, así como las especies *E. dispar*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. cecorum* y *E. columbae*, constituyen líneas evolutivamente independientes; no obstante, *E. cecorum* está más relacionado con *E. columbae* que con los restantes enterococos, por lo que ambas especies constituirían el grupo IV, o grupo *E. cecorum*. La última clasificación del género *Enterococcus* aparecida en la literatura, así como la antigua denominación de las especies que lo integran se muestra en la Tabla II.4.

II.2.3.1. Características generales

Los enterococos son bacterias Gram-positivas, de morfología cocoide, no esporuladas y que aparecen en las preparaciones al microscopio formando pares y/o cadenas cortas. El tamaño de

Tabla II.4. Clasificación taxonómica del género *Enterococcus*

| Especies | Denominación previa | Habitats principales | Referencias |
|-----------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Grupo I o <i>E. faecium</i> | | | |
| <i>E. faecium</i> | <i>S. faecium</i> | Tracto intestinal del hombre y animales | Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) |
| <i>E. durans</i> | <i>S. durans</i> | Procesos clínicos | Collins <i>et al.</i> (1984a) |
| <i>E. hirae</i> | - | Tracto intestinal de los animales | Farrow y Collins (1985) |
| <i>E. mundtii</i> | - | Plantas, ensilados, hierba y suelo | Collins <i>et al.</i> (1986a) |
| Grupo II o <i>E. avium</i> | | | |
| <i>E. avium</i> | <i>S. avium</i> | Tracto intestinal de mamíferos y aves de granja | Collins <i>et al.</i> (1984a) |
| <i>E. raffinosus</i> | - | Procesos clínicos | Collins <i>et al.</i> (1989b) |
| <i>E. malodoratus</i> | <i>S. faecalis</i> | Originariamente queso <i>Gouda</i> | Collins <i>et al.</i> (1984a) |
| <i>E. pseudoavium</i> | - | Mastitis bovinas | Collins <i>et al.</i> (1989b) |
| Grupo III o <i>E. gallinarum</i> | | | |
| <i>E. casseliflavus</i> | <i>S. casseliflavus</i> | Plantas, ensilados, hierba y suelo | Collins <i>et al.</i> (1984a) |
| <i>E. gallinarum</i> | <i>S. gallinarum</i> | Tracto intestinal de aves de granja | Collins <i>et al.</i> (1984a) |
| Grupo IV o <i>E. cecorum</i> | | | |
| <i>E. cecorum</i> | <i>S. cecorum</i> | Procesos clínicos y animales | Williams <i>et al.</i> (1989) |
| <i>E. columbae</i> | - | Tracto intestinal de palomas | Devriese <i>et al.</i> (1990) |
| <i>E. faecalis</i> | <i>S. faecalis</i> | Tracto intestinal del hombre y animales | Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) |
| <i>E. dispar</i> | - | Humanos | Collins <i>et al.</i> (1991b) |
| <i>E. saccharolyticus</i> | <i>S. saccharolyticus</i> | Lechos y piel del ganado | Rodrigues y Collins (1990) |
| <i>E. sulfureus</i> | - | Plantas | Martínez-Murcia y Collins (1991b) |
| <i>E. flavescens</i> ^a | - | Procesos clínicos | Pompei <i>et al.</i> (1992b) |

^aNo se dispone de información sobre la secuencia de la subunidad 16S del ARNr. Tomado de Stiles y Holzapfel (1997).

las colonias de las especies del grupo *E. avium* es menor que el de la especie *E. faecium* y que el de las especies del grupo *E. gallinarum*. En cuanto a la composición de la pared celular, el peptidoglicano de todas las especies es del tipo Lys-D-Asp, excepto en el caso de *E. faecalis* que es del tipo Lys-Ala₂₋₃. Respecto a los marcadores quimiotaxonómicos, *E. faecalis* posee dimetilmenaquinonas con 9 unidades de isopreno, mientras que *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* presentan menaquinonas que contienen 7 u 8 unidades de isopreno y el resto de las especies carecen de menaquinonas y quinonas isoprenoides (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987).

Los enterococos son microorganismos quimiótrofos y su desarrollo depende fundamentalmente de la presencia de hidratos de carbono. Asimismo, poseen un metabolismo fermentativo, por lo que son incapaces de sintetizar ATP por respiración, pero, sin embargo, son microorganismos anaerobios facultativos. Los enterococos son microorganismos catalasa-negativos e incapaces de sintetizar citocromos; no obstante, se ha observado que *E. faecalis* es capaz de sintetizarlos en presencia de una fuente de hemina (Ritchey y Seeley, 1976). La fermentación de la glucosa tiene lugar a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof, con la producción de L-ácido láctico como principal metabolito final. Cuando los enterococos se cultivan en medio líquido, el pH final detectado es inferior a 4,2 (Bridge y Sneath, 1982). Bajo condiciones de aerobiosis, estos microorganismos convierten la glucosa además a ácido acético, acetoina y CO₂ (London y Appleman, 1962) y, asimismo, se ha observado que en estas condiciones la masa celular final es un 40% superior a la obtenida en condiciones de anaerobiosis. En cuanto al aprovechamiento de las pentosas, todos los enterococos fermentan la ribosa (Bridge y Sneath, 1982), a excepción de *E. flavescens* (Pompei *et al.*, 1992b). Finalmente, algunos enterococos pueden también obtener energía a partir de la fermentación de diversos aminoácidos como la arginina o la serina (Devriese *et al.*, 1992). Aunque se dispone de escasa información sobre la distribución de los enzimas que intervienen en las rutas metabólicas, se conoce que, por ejemplo, *E. faecalis* y *E. avium* poseen los enzimas superóxido dismutasa (SOD), NADH oxidasa y NADH peroxidasa y, además, los enzimas piruvato oxidasa y L-lactato oxidasa, respectivamente. En lo que respecta a *E. faecium*, Zitzelsberger *et al.* (1984) han confirmado la presencia de SOD, NADH oxidasa y L-lactato oxidasa.

Los enterococos presentan exigentes requerimientos nutritivos, siendo necesarios para su crecimiento, al menos, 10 aminoácidos, bases púricas y pirimidínicas y ciertas vitaminas como, entre otras, la biotina, el nicotinato, el pantotenato, la riboflavina y la piridoxina (Niven y Sherman, 1944). Además, *E. faecalis* requiere ácido fólico y, en el caso de utilizar el piruvato como fuente de energía, lipoato (Deibel, 1964).

Los enterococos crecen en presencia de un 40% de sales biliares, hidrolizan la esculina, no son inhibidos por un 0,04% de azida sódica y presentan una respuesta positiva a la prueba de MR-VP (producción de ácido y acetoina a partir de la ribosa), excepto las especies *E. flavescens* (MR negativo) y *E. saccharolyticus* (VP negativo). Por otra parte, las especies *E. sulfureus* y *E. saccharolyticus*, así como las de los grupos *E. avium* y *E. cecorum*, no hidrolizan la arginina. En cuanto a los patrones de fermentación de hidratos de carbono, las especies del género *Enterococcus* muestran una gran variabilidad, por lo que el análisis de los mismos puede ser de gran utilidad para su diferenciación (Devriese *et al.*, 1993). Las especies del grupo *E. gallinarum* son móviles y las especies *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus* y *E. flavescens* son

pigmentadas. Los enterococos son microorganismos ureasa-negativos y algunas especies, como las de grupo *E. avium*, son α -hemolíticas. En lo que respecta a las pruebas serológicas, se tiene constancia de que no todas las especies del género presentan el antígeno D de Lancefield; así, pues, está ausente en las especies del grupo *E. cecorum*, en algunas cepas del grupo *E. avium* y en las especies *E. saccharolyticus*, *E. dispar* y *E. sulfureus*. Asimismo, aunque la mayoría de los enterococos se desarrollan a 10 y a 45°C, a valores de pH 4,4 y 9,6 y en presencia de un 6,5% de NaCl, las especies *E. dispar* y *E. sulfureus* no crecen a 45°C y las especies del grupo *E. cecorum* no lo hacen a 10°C y, por otra parte, estas últimas y las del grupo *E. avium* presentan un crecimiento muy lento en presencia de un 6,5% de NaCl (Devriese *et al.*, 1993; Devriese y Pot, 1995).

En lo que respecta al contenido G+C, todas las especies del género presentan un 38-41 mol%, excepto en el caso de la especie *E. casseliflavus*, cuyo valor es ligeramente superior (41-45 mol%).

II.2.3.2. Habitats

Los enterococos forman parte de la flora habitual del tracto intestinal del hombre y de algunos animales (Tabla II.4), influyendo favorablemente en su equilibrio microbiano (Devriese *et al.*, 1992; Tannock, 1992). Algunas especies parecen mostrar una gran especificidad en cuanto al hospedador, así, por ejemplo, *E. durans* se ha aislado de intestinos humanos y de pollo, pero no de otros animales de granja y *E. faecium* es la especie que se aísla con mayor frecuencia de pollos sanos y de cerdos. Las especies que se aíslan del hombre con mayor frecuencia son *E. faecalis* y *E. faecium*, si bien la incidencia de estas dos especies parece estar influida por diversos factores como, entre otros, la dieta y la edad del hospedador. Así, por ejemplo, en países como Reino Unido y Estados Unidos se aíslan mayoritariamente cepas de *E. faecalis*, mientras que en la India, Japón y Uganda la incidencia de *E. faecium* es igual o superior a la de *E. faecalis* (Finegold *et al.*, 1974). Por otra parte, los pollos portan y excretan un alto contenido de *E. faecalis* durante las primeras semanas de vida y durante su desarrollo descende la presencia de esta cepa; sin embargo, la población de *E. faecium* se mantiene constante y aumenta la presencia de *E. gallinarum* (Kaukas *et al.*, 1986). En determinados hospedadores, se ha observado que los enterococos constituyen la flora intestinal predominante durante los 2-3 primeros días de vida, y que tras aproximadamente 2 semanas su presencia se reduce considerablemente (Devriese *et al.*, 1992).

E. faecalis y *E. faecium*, así como algunas especies pigmentadas, como *E. mundtii* y *E. casseliflavus*, se han aislado también de plantas e insectos (Martin y Mundt, 1972). Por otra parte, algunas especies de enterococos se han aislado de procesos clínicos en el hombre y en los animales (Gálvez *et al.*, 1986; Devriese *et al.*, 1987; Facklam *et al.*, 1989; Pompei *et al.*, 1991).

Finalmente, los enterococos se han aislado de numerosos alimentos, entre los que se incluyen la leche y los productos lácteos (McKay, 1990; Vlaemynck *et al.*, 1994; Olasupo *et al.*, 1994; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Farías *et al.*, 1996), los embutidos crudos curados (Genigeorgis *et al.*, 1976; Garriga *et al.*, 1993a; Samelis *et al.*, 1994; Cintas *et al.*, 1995, 1998a; Devriese *et al.*, 1995; Aymerich, 1996), los vegetales y los ensilados (McKay *et al.*, 1990; Villani *et al.*, 1993; Torri Tarelli *et al.*, 1994), las aceitunas negras (Franz *et al.*, 1996) y el pescado (Ben

Embarek *et al.*, 1994).

II.2.4. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas contribuyen favorablemente en la conservación de los alimentos en general y de los productos cárnicos fermentados en particular debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en la materia prima y convertirse, por lo tanto, en la flora predominante de estos productos. Los principales mecanismos de antagonismo microbiano son la competencia por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato y la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), con el consiguiente descenso del pH (Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Además, las bacterias lácticas producen otras sustancias antimicrobianas como el etanol, el dióxido de carbono, el diacetilo, el acetaldehído, el peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, el benzoato, los isómeros D de los aminoácidos, la reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, sustancias proteicas denominadas bacteriocinas (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Piard y Desmazeaud, 1991; De Vuyst y Vandamme, 1994b). Debido al creciente interés, tanto de la comunidad científica como de los sectores industriales, en la investigación de las bacteriocinas como bioconservantes naturales de los alimentos formando parte de un sistema de barreras múltiples, así como a que el objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización bioquímica y genética de nuevas bacteriocinas de interés en la industria alimentaria, las características principales de estas sustancias antimicrobianas se describirán detalladamente en las secciones II.3 y II.4. No obstante, a continuación se exponen brevemente las características más relevantes y los mecanismos de acción de otros compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas que también presentan interés desde un punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario por su aplicación como bioconservantes en la industria alimentaria.

II.2.4.1. Ácidos orgánicos y etanol

Los ácidos orgánicos, una vez sintetizados, son liberados al medio extracelular donde, además de contribuir a las características organolépticas del producto, inhiben o retardan el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y patógenos, entre los que se encuentran *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. y *Clostridium* spp. (Przybylski y Witter, 1979; Adams y Halls, 1988). También se ha descrito que los ácidos orgánicos inhiben la germinación de las esporas de *Bacillus cereus* (*B. cereus*) (Wong y Chen, 1988) y *Cl. tyrobutyricum* (Blocher y Busta, 1983) y, fundamentalmente el ácido acético, el desarrollo de algunos hongos y levaduras (Baird-Paker, 1980).

El efecto antimicrobiano neto de los ácidos orgánicos débiles depende de la concentración de sus formas moleculares (fracción no disociada) y aumenta, por lo tanto, a valores bajos de pH (Rubin y Vaughan, 1979; Baird-Paker, 1980; Adams y Halls, 1988). Las formas no disociadas penetran en el interior de las células, interfiriendo con funciones metabólicas esenciales, como la translocación de protones y sustratos, la fosforilación oxidativa y la reducción del pH intracelular (Baird-Parker, 1980). Por otra parte, una elevada concentración de protones (H^+) en el medio extracelular disminuye considerablemente su pH, así como el pH intracelular, lo cual tiene

efectos perjudiciales sobre la pared celular, membrana plasmática externa, espacio periplásmico y membrana citoplasmática interna y contribuye, además, a la desnaturalización de diversas enzimas y a la desestabilización de la permeabilidad y del potencial de las membranas (Booth y Kroll, 1989).

II.2.4.2. Peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno

En condiciones de aerobiosis las bacterias lácticas sintetizan peróxido de hidrógeno a partir de la forma reducida de la nicotinamida-adenin-dinucleótido, por acción de una flavoproteína NADH:H₂O₂ oxidasa (Condon, 1987). Así mismo, estos microorganismos pueden generar peróxido de hidrógeno a partir de los aniones superóxido (O₂⁻) endógenos, por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) o por acción del catión manganeso presente a elevadas concentraciones (20-25 mmol/L) en el citoplasma de las bacterias lácticas que carecen de SOD (Archibald y Fridovich, 1981). Por otra parte, en presencia del peróxido de hidrógeno, los aniones superóxido pueden generar radicales hidroxilo (-OH⁰) (De Vuyst y Vandamme, 1994b). El peróxido de hidrógeno formado se acumula en el medio de cultivo o en el sustrato, ya que las bacterias lácticas no poseen catalasa en sentido estricto, debido a su incapacidad de sintetizar hemoporfirinas; no obstante, estos microorganismos se autoprotegen de los efectos nocivos de su acumulación mediante un control de las acciones enzimáticas de la NADH:H₂O₂ oxidasa, la NADH:H₂O oxidasa y la NADH peroxidasa, a través de sus actividades pseudocatalásicas o por su liberación al medio extracelular (Condon, 1987).

El efecto bactericida o bacteriostático del peróxido de hidrógeno, de los radicales hidroxilo y de los aniones superóxido es debido a su elevado poder oxidante, que provoca (i) la peroxidación de los lípidos de membrana, incrementando de este modo la permeabilidad celular, y (ii) la inactivación de coenzimas (ej. coenzima A) y enzimas como, entre otras, la gliceraldehído-3fosfato-deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, debido a la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (Kong y Davidson, 1980). La elevada toxicidad de estos compuestos también es debida a su capacidad de destruir estructuras básicas moleculares de las proteínas celulares y de producir daños en el material genético, como la rotura de enlaces intra e intercatenarios del ADN, la alteración de bases nitrogenadas y la inhibición de la replicación cromosómica (Piard y Desmazaud, 1991).

Debido al potente efecto antimicrobiano del peróxido de hidrógeno, se ha sugerido el empleo como cultivos iniciadores de bacterias lácticas productoras del mismo, principalmente del género *Lactobacillus*. En este sentido, Gilliland y Speck (1977) comprobaron que la producción de peróxido de hidrógeno por *Lb. acidophilus* era parcialmente responsable de la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos de origen alimentario como, entre otros, *St. aureus*.

Finalmente, el peróxido de hidrógeno puede ejercer su efecto antimicrobiano de forma indirecta al reaccionar con otras sustancias presentes en el sustrato y originar compuestos antimicrobianos adicionales. Concretamente en la leche cruda, el peróxido de hidrógeno activa el sistema antimicrobiano lactoperoxidasa (SLP) ya que oxida el tiocianato, en una reacción catalizada por la lactoperoxidasa, produciéndose compuestos antimicrobianos como, entre otros, el hipotiocianato y el tiocianógeno (Thomas, 1985). La toxicidad de estos compuestos parece ser debida a su capacidad de oxidar los grupos sulfhidrilo de proteínas estructurales y enzimas

metabólicos vitales para los microorganismos, como la aldolasa, la hexoquinasa y la gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (Björck, 1985). Las bacterias lácticas son capaces de activar el sistema antimicrobiano lactoperoxidasa cuando se desarrollan en condiciones de aerobiosis y resultan minimamente afectadas por el mismo (Carlsson *et al.*, 1983). Por el contrario, el SLP es un potente inhibidor del desarrollo de un gran número de bacterias Gram-positivas, como *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*, y Gram-negativas, como *Pseudomonas aureaginosa* (*Ps. aureaginosa*), *E. coli* y *S. typhimurium* (Pruitt y Reiter, 1985).

II.2.4.3. Dióxido de carbono, diacetilo y acetaldehído

Las bacterias lácticas heterofermentativas producen dióxido de carbono como metabolito final de la fermentación de las hexosas. Asimismo, algunas bacterias lácticas homofermentativas son capaces de producir este compuesto a partir del malato y del citrato (London, 1990). La producción de dióxido de carbono es muy importante desde un punto de vista tecnológico en la industria láctea, ya que es responsable de la formación de los “ojos” característicos de algunos tipos de quesos. Por otra parte, el dióxido de carbono ejerce una acción antimicrobiana frente a diversos microorganismos, ya que crea condiciones de anaerobiosis en el sustrato en el que se produce, contribuye a la disminución del pH extra e intracelular y se acumula en la bicapa lipídica de las membranas celulares provocando su desestabilización (Eklund, 1984). La actividad antimicrobiana del dióxido de carbono es especialmente importante en la conservación de carnes, pescados, frutas, verduras y hortalizas refrigeradas para inhibir el crecimiento de microorganismos psicrótrofos, y en la fermentación de vegetales y ensilados para prevenir el desarrollo de mohos (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Algunas bacterias lácticas producen diacetilo, acetoina y 2-3 butanodiol a partir del piruvato (Condon, 1987). La cantidad de diacetilo formado a partir de la fermentación de las hexosas es pequeña; no obstante, en presencia de citrato y otra fuente de energía metabolizable (hexosas) se producen cantidades significativas de este compuesto, ya que el citrato es degradado, vía piruvato, a diacetilo (Starrenburg, 1991). Éste, una vez sintetizado, se libera al medio exocelular donde, además de contribuir al desarrollo del aroma de los productos fermentados, como la mantequilla y algunos tipos de quesos, ejerce una acción antimicrobiana frente a un gran número de bacterias Gram-negativas como, entre otras, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp. (Jack, 1982a), hongos y levaduras (Jay *et al.*, 1983) y en menor medida bacterias Gram-positivas como *St. aureus* (Jack, 1982b). Respecto al mecanismo de acción antimicrobiano, Jay (1986) sugiere que el diacetilo reacciona con la arginina de los enzimas microbianos, inactivándolos por el bloqueo o modificación de sus centros catalíticos. Además, el diacetilo inactiva la proteína de unión de la arginina de las bacterias gram-negativas y de este modo interfiere en la utilización de esta fuente de nitrógeno.

El acetaldehído es otro de los metabolitos producidos por las bacterias lácticas heterofermentativas a partir de los hidratos de carbono. Este compuesto es reducido a etanol por acción de la NAD-alcohol dependiente deshidrogenasa, por lo que la ausencia o represión de este enzima se traduce en la secreción y acumulación de acetaldehído en el medio extracelular. Asimismo, algunas bacterias lácticas contienen una aldolasa que metaboliza la treonina en acetaldehído y glicina. Las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores en la

elaboración del yogur (*Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*) no contienen el enzima NAD-alcohol dependiente deshidrogenasa y producen acetaldehído a partir de la treonina (De Vuyst y Vandamme, 1994b), lo que confiere el aroma característico a este producto. Por otra parte, Kulshrestha y Marth (1974a; 1974b; 1974c) han demostrado que concentraciones de acetaldehído entre 10-100 ppm inhiben el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos de la leche, como *St. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli*. Considerando estos resultados, y dada la concentración de acetaldehído en el yogur (25 ppm), sería interesante la obtención, mediante técnicas de ingeniería genética, de cepas hiperproductoras de esta sustancia, con el fin de incrementar su eficacia como antagonistas del desarrollo de microorganismos no deseables.

II.2.4.4. Reuterina

Lb. reuteri es una bacteria láctica heterofermentativa que predomina en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales y que fue aislada por primera vez por Lerche y Reuter (1962). Axelson *et al.* (1989) comprobaron que cuando *Lb. reuteri* se desarrollaba bajo condiciones de anaerobiosis en presencia de glicerol producía una sustancia, denominada reuterina, con un tamaño molecular de 200 dáltones (Da) y resistente a la acción de enzimas proteolíticos (Axelson *et al.*, 1989). Posteriormente, la reuterina se aisló, purificó e identificó como una mezcla en equilibrio de monómeros, monómeros hidratados y dímeros cíclicos del compuesto β -hidroxipropionaldehído (Talarico *et al.*, 1988; Talarico y Dobrogosz, 1989), producido durante el metabolismo anaerobio del glicerol en una reacción catalizada por la glicerol deshidratasa dependiente de la coenzima vitamina B12 (Talarico *et al.*, 1988; Chung *et al.*, 1989). Asimismo, el β -hidroxipropionaldehído puede ser reducido a 1-3 propanodiol por la acción de un enzima oxidoreductasa dependiente NAD⁺ producido por *Lb. reuteri* (Talarico *et al.*, 1990). Estos dos enzimas forman parte de una ruta metabólica en la cual se utiliza el glicerol como aceptor de hidrógeno durante el metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono. *Lb. reuteri* produce más β -hidroxipropionaldehído del que es reducido por lo que excreta su exceso al medio donde ejercerá su acción antimicrobiana. El mecanismo de acción de la reuterina puede consistir en la inactivación de los enzimas que poseen grupos sulfhidrilo, tales como la ribonucleótido reductasa, un enzima universal que cataliza la primera etapa de la biosíntesis del ADN (Talarico y Dobrogosz, 1989).

La reuterina posee un amplio y potente espectro de acción e inhibe el desarrollo de diversas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos, levaduras y protozoos (Axelson *et al.*, 1989; Chung *et al.*, 1989). En los últimos años se han publicado varios trabajos sobre la posible utilización de *Lb. reuteri* y/o de la reuterina como bioconservantes en la industria alimentaria. Daeschel (1989) observó que tras la adición de reuterina a la carne fresca de vaca disminuía considerablemente el número de coliformes. Asimismo, Lindgren y Dobrogosz (1990) propusieron la adición de *Lb. reuteri* y glicerol para extender la vida útil de productos frescos perecederos, como los pescados refrigerados, ya que disminuye la tasa de microorganismos Gram-negativos que presentan de forma natural.

II.3. BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

La primera vez que estableció la asociación entre la actividad antimicrobiana de un microorganismo y la producción de una sustancia fue en 1925, cuando Gratia observó que tras cultivar una cepa de *E. coli* V en medio líquido ésta producía una sustancia dializable y estable al calor que inhibía el desarrollo de *E. coli*, a la cual denominó colicina V (actualmente microcina, Faith *et al.*, 1992). Posteriormente, como resultado de las investigaciones de Fredericq (1948), se describieron nuevas colicinas producidas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que se clasificaron en 20 tipos según su adsorción específica a determinados receptores. Este mismo investigador observó que algunos estafilococos producían sustancias del tipo de las colicinas que inhibían el desarrollo de otros microorganismos de su mismo género y de otras bacterias Gram-positivas pero no el de bacterias Gram-negativas (Fredericq, 1946).

En 1928, Rogers describió por primera vez la producción de proteínas antimicrobianas por bacterias lácticas, concretamente por las especies *Streptococcus lactis* (actualmente *L. lactis* subesp. *lactis*) y *Lactobacillus bulgaricus* (actualmente *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*). Posteriormente, Matick y Hirsch (1947) observaron que diversas cepas de estreptococos del grupo N de Lancefield producían un compuesto antimicrobiano y lo denominaron nisina (del inglés *nisin*, *Group N Inhibitory Substance* y la terminación -in, empleada comúnmente para designar los antibióticos). Asimismo, Whitehead (1933) describió la producción de una sustancia antimicrobiana por diversas cepas de *L. lactis* subesp. *cremoris* de origen lácteo, a la cual denominó diplococcina, debido a la ordenación diplococal que mostraban las bacterias productoras.

II.3.1. Definición y nomenclatura de las bacteriocinas

El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob *et al.* (1953) con el objeto de englobar las diferentes sustancias proteicas con actividad antimicrobiana producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las bacteriocinas se definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano del tipo de las colicinas, caracterizadas por (i) su adsorción a receptores de membrana específicos; (ii) su actividad intraespecífica y, (iii) su biosíntesis letal (Hardy, 1975). Estudios posteriores acerca de las colicinas evidenciaron que estas sustancias se caracterizaban, además, por (iv) poseer un componente proteico biológicamente activo; (v) ejercer un modo de acción bactericida y, (vi) por la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad.

En la revisión de las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas de Tagg *et al.* (1976) se considera que los seis criterios mencionados anteriormente son válidos para las bacteriocinas prototipo o colicinas pero que, sin embargo, las bacteriocinas de las bacterias gram-positivas muestran discrepancias con algunos de ellos, concretamente el espectro de acción, la presencia de receptores específicos, la localización de los determinantes genéticos y la biosíntesis letal. Por este motivo, Tagg *et al.* sugirieron que se debían considerar bacteriocinas a todas aquellas sustancias antimicrobianas bacterianas que, al menos, cumplieren los criterios (iv) y (v) (presencia de un componente proteico biológicamente activo y un modo de acción bactericida).

En los últimos años se ha producido un extraordinario avance en la investigación de las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas, y principalmente de las bacterias lácticas, lo que ha

permitido determinar su estructura y sus características físico-químicas, así como elucidar su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos implicados en su biosíntesis, procesamiento, transporte y en la regulación de su producción. Como consecuencia de los conocimientos generados tras estas investigaciones, en la última revisión de las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas, Jack *et al.* (1995) proponen una nueva y más amplia definición de las bacteriocinas basada en criterios diferentes a los empleados tradicionalmente. Así, pues, estos autores definen las bacteriocinas como un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas bacterianas de síntesis ribosomal que se secretan al medio exocelular con o sin modificaciones posttraduccionales y que poseen un espectro de acción antimicrobiano que puede ser reducido y limitado, al menos, a algunas cepas de su misma especie; por otra parte, el microorganismo productor debe poseer algún mecanismo que le confiera inmunidad a su propia bacteriocina.

Para unificar la nomenclatura de las bacteriocinas, Tagg *et al.* (1976) propusieron emplear los mismos criterios que para los antibióticos; es decir, añadir preferentemente el sufijo -cina al nombre genérico del microorganismo productor (ej. enterocinas, bacteriocinas producidas por microorganismos del género *Enterococcus*) o, en su caso, al nombre de la especie (ej. curvacina, bacteriocina producida por *Lb. curvatus*). Para diferenciar las bacteriocinas producidas por cepas de la misma especie sugirieron añadir a cualquiera de los términos anteriores letras consecutivas del abecedario o bien el nombre arbitrario asignado a la cepa productora. No obstante, se han originado situaciones confusas ya que estos criterios no se han aplicado en muchas de las bacteriocinas identificadas posteriormente y se ha asignado el término bacteriocina a sustancias poco caracterizadas. Así, por ejemplo, se han empleado los términos carnobacteriocina, carnocina, piscicolina y piscicocina para denominar las bacteriocinas producidas por distintas cepas de la especie *Carnobacterium piscicola*. Asimismo, se han utilizado los nombres pediocina A y pediocina PA-1 para denominar las bacteriocinas producidas por *P. pentosaceus* FBB61 y *P. acidilactici* PAC 1.0, respectivamente.

Por otra parte, se han asignado nombres diferentes a bacteriocinas que, una vez caracterizadas, resultaron ser idénticas a otras descritas previamente (ej. pediocinas AcH, PC, JD, 347, SJ-1, UL5 y PO2, iguales que la pediocina PA-1; sakacina 674 y bavaricina A, iguales que la sakacina P). Para evitar estas situaciones, Jack *et al.* (1995) han sugerido que no se asigne un nombre específico a una bacteriocina presumiblemente nueva hasta que no se conozca su secuencia aminoacídica y la secuencia nucleotídica de su gen estructural y, hasta entonces, proponen emplear para su denominación el término BLIS (del inglés, *Bacteriocin Like Inhibitory Substance*) acompañado del nombre asignado a la cepa productora (ej. BLIS HL1, bacteriocina producida por *P. acidilactici* HL1). Una vez confirmado que se trata de una nueva bacteriocina, proponen denominarla empleando el nombre del género o de la especie del microorganismo productor y el sufijo -cina (ej. pediocina HL1 o acidilacticina HL1). Por otra parte, sugieren que las bacteriocinas que tienen la misma estructura primaria (ej. pediocinas PA1/AcH, sakacina A / curvacina A, diplococcina/lactococcina A), deberían adquirir el nombre que originariamente se asignó a la primera que se mencionó en la bibliografía. En cuanto a la denominación de los genes que codifican la síntesis de las bacteriocinas y sus genes asociados, estos autores proponen emplear la misma nomenclatura que la adoptada en el caso de la nisina. Así, pues, para

denominar los genes estructurales se deben emplear las tres primeras letras del nombre de la bacteriocina correspondiente seguido de la letra A (ej. *nisA*, gen estructural de la nisina); en el caso de bacteriocinas que requieren la presencia simultánea de dos péptidos para su ejercer su actividad biológica se deben añadir números consecutivos a la letra correspondiente (ej. A1 y A2). Para denominar los genes que codifican la proteína de inmunidad, la proteasa de procesamiento y las proteínas implicadas en su transporte, modificaciones posttraduccionales y regulación proponen añadir a las tres primeras letras del nombre las letras *I* (*nisI*, inmunidad); *P* (*nisP*, proteasa); *T*, *E*, *F*, *G* (*nisT*, transporte); *B*, *C*, *D* (*nisB*, modificaciones) y *R*, *K*, *Q* (*nisR*, reguladores). En cuanto a los genes que codifican productos de función desconocida sugieren denominarlos con el término marco de lectura abierto u *orf* (del inglés, *Open Reading Frame*), seguido de números consecutivos dependiendo del orden que ocupen en el operón correspondiente (ej. *orf1* y *orf2*).

II.3.2. Bacteriocinogenicidad de las bacterias lácticas

La bacteriocinogenicidad, o capacidad de producir bacteriocinas, es un fenotipo muy extendido entre las bacterias lácticas, como lo demuestra el que en la actualidad se hayan descrito bacteriocinas de todos los géneros más comúnmente asociados con los alimentos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* (De Vuyst y Vandamme, 1994b; Cintas, 1995).

Desde que en 1988 Klaenhammer revisó por primera vez las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas han aparecido en la literatura otros excelentes trabajos de revisión en los que se recopilan las principales características bioquímicas y genéticas de este grupo de sustancias antimicrobianas (Schillinger, 1990; Stiles y Hastings, 1991; Daeschel, 1992; Piard y Desmazeaud, 1992; Klaenhammer, 1993; Nettles y Barefoot, 1993; Dodd y Gasson, 1994; Cintas, 1995; Jack *et al.*, 1995; Sahl *et al.*, 1995; Nes y Tagg, 1996; Nes *et al.*, 1996).

A continuación, se ofrece una revisión detallada de todas las bacteriocinas, caracterizadas o no, producidas por bacterias del género *Enterococcus*. Asimismo, se recopilan las bacteriocinas que se describieron por primera vez en los restantes géneros y las que actualmente están mejor caracterizadas a nivel bioquímico y genético (Cintas, 1995; Jack *et al.*, 1995; Nes y Tagg, 1996; Nes *et al.*, 1996).

II.3.2.1. Bacteriocinas del género *Enterococcus*

La capacidad bacteriocinogénica de las especies del género *Enterococcus* se conoce desde hace tiempo (Kjems, 1955; Brock *et al.*, 1963); no obstante, no se tuvieron pruebas certeras hasta 1975, cuando Kramer y Brandis purificaron y caracterizaron parcialmente dos bacteriocinas, las enterocinas E1A y E1B, producidas por cepas de *E. faecium*, activas frente a otros enterococos y algunas especies del género *Listeria*. En la actualidad se han descrito más de 40 bacteriocinas producidas por las especies *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. hirae*, si bien aún no se ha completado la caracterización de la mayoría de ellas (Tablas II.5 y II.6). Una gran parte de los enterococos bacteriocinogénicos de origen alimentario se han aislado de productos lácteos (McKay, 1990; Villani *et al.*, 1993; Olasupo *et al.*, 1994; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Vlaemynck *et al.*, 1994). No obstante, McKay (1990) aisló de ensilados vegetales varias cepas de *E. faecium*

productoras de bacteriocinas y, a su vez, Ben Embarek *et al.* (1994) y Franz *et al.* (1996) aislaron, respectivamente, cepas bacteriocinogénicas de *E. faecium* de filetes de pescado del tipo *sous-vide* y de aceitunas negras. Por otra parte, Cintas *et al.* (1995, 1998a) y Aymerich *et al.* (1996) aislaron cepas bacteriocinogénicas de *E. faecium* de embutidos crudos curados españoles. También se han aislado enterococos productores de bacteriocinas de heces de terneros sanos, concretamente cepas de *E. hirae* (Siragusa, 1992) y *E. faecium* (Lauková *et al.*, 1993). Las bacteriocinas sintetizadas por las distintas especies del género *Enterococcus* son muy interesantes en la industria alimentaria ya que son compuestos termoestables y toleran un amplio rango de pHs, si bien son más activas a valores ácidos; asimismo, la mayoría de estas sustancias son muy activas frente a *Listeria* spp., por lo que, una vez caracterizadas, podrían emplearse como bioconservantes en la prevención de brotes de listeriosis de origen alimentario (Parente y Hill, 1992b; 1992c; Siragusa, 1992; Giraffa, 1995).

Las enterocinas mejor caracterizadas bioquímicamente y genéticamente hasta la fecha son la enterocina 1146, producida por *E. faecium* DPC1146 (Parente y Hill, 1992a; 1992b; 1992c; Parente y Ricciardi, 1994); la enterocina A, producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996) y las enterocinas L50A y L50B, producidas por *E. faecium* L50 (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a; 1998b). Asimismo, recientemente se ha descrito la caracterización a nivel genético de la bacteriocina 31, producida por *E. faecalis* YI17, aunque aún no se ha caracterizado bioquímicamente (Tomita *et al.*, 1996).

II.3.2.2. Bacteriocinas de los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*

Klaenhammer (1993) propuso clasificar las bacteriocinas del género *Lactococcus* en 4 grupos, atendiendo a la presencia de aminoácidos modificados posttraduccionalmente, estabilidad térmica y espectro de acción: los lantibióticos, las diplococcinas (Davey y Richardson, 1981), las lactococcinas (Van Belkum *et al.*, 1989; 1991a; 1992) y las lactostrepcinas (Kozak *et al.*, 1978). En la actualidad se han descrito más de 50 bacteriocinas lactococales, producidas por las dos subespecies de mayor importancia en la industria láctea, *L. lactis* y *L. cremoris*, lo que convierte a este género en el más prolífico de las bacterias lácticas, junto con el género *Lactobacillus*, en lo que respecta a la producción de bacteriocinas.

En el grupo de los lantibióticos se incluyen bacteriocinas con aminoácidos modificados posttraduccionalmente que presentan un amplio espectro de acción frente a bacterias Gram-positivas. El lantibiótico nisina A, producido por diversas cepas de *L. lactis*, es la bacteriocina mejor caracterizada a nivel bioquímico y genético (De Vuyst y Vandamme, 1994c; Siegers *et al.*, 1995; Ra *et al.*, 1996) y la única aceptada internacionalmente como bioconservante alimentario (Food and Drug Administration, 1988; Delves-Broughton, 1990). La nisina A posee un espectro de acción bactericida muy amplio, que incluye la mayoría de las bacterias Gram-positivas, incluidos microorganismos alterantes y patógenos (Hurst, 1981; Harris *et al.*, 1992). Mulders *et al.* (1991) aislaron e identificaron una variante natural de la nisina A, la nisina Z, producida por otras cepas de *L. lactis*, que se diferencia solamente en el residuo aminoacídico en posición 27 (asparagina en la nisina Z e histidina en la nisina A) y en que es algo más activa (Mulders *et al.*, 1991; De Vos *et al.*, 1993). Otros lantibióticos producidos por *L. lactis* son la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1992) y la lactococcina DR (Dufour *et al.*, 1991). Recientemente, se han

Tabla II.5. Bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium*

| Bacteriocina | Cepa productora | Espectro de acción | Termoestabilidad y tolerancia al pH | Tamaño molecular | Referencias |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Enterocina E1A | <i>E. faecium</i> E1A | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. innocua</i> <i>Ls. monocytogenes</i> | Termoestable ^a | 10.000 Da | Krämer y Brandis (1975) |
| Enterocina E1B | <i>E. faecium</i> E1B | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. innocua</i> <i>Ls. monocytogenes</i> | Termolábil ^a | >1.000 Kda (parcialmente purificada) | Krämer y Brandis (1975) |
| Enterococcina Sf3 | <i>E. faecium</i> 3 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i> <i>Cl. butyricum</i> | 10 min. 100°C | 9.000 Da | Krämer <i>et al.</i> (1983) |
| Bacteriocinas (2) | <i>E. faecium</i> NCIB2699 <i>E. faecium</i> NCIB2702 | <i>Listeria</i> spp. | ND | ND | McKay (1990) |
| Enterocina 1146 | <i>E. faecium</i> DPC1146 | <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. sake</i> <i>L. lactis</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Cl. tyrobutyricum</i> <i>Ls. monocytogenes</i> | 10 min. 121°C, pH 5,0 pH 3,0-5,0 | 3.000 Da | Parente y Hill (1992b) Parente y Hill (1992c) |
| Bacteriocinas (3) | <i>E. faecium</i> JBL1061 <i>E. faecium</i> JBL1083 <i>E. faecium</i> JBL1351 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>L. lactis cremoris</i> <i>Ls. monocytogenes</i> | 20 min. 121°C, pH 6,8 pH 3,0-10,0 | > 8.000 Da | Arihara <i>et al.</i> (1993) |
| Bacteriocina | <i>E. faecium</i> CCM4231 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Cl. perfringens</i> | 30 min. 60°C | ND | Lauková <i>et al.</i> (1993) |

Tabla II.5. (continuación)

| Bacteriocina | Cepa productora | Espectro de acción | Termoestabilidad y tolerancia al pH | Tamaño molecular | Referencias |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Bacteriocina | <i>E. faecium</i> 100 | <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. lactis</i> <i>Bacillus cereus</i> | 5 min. 100°C pH < 5,0 | >200.000 Da (agregados) | Kato <i>et al.</i> (1993) |
| Enterocina 01 | <i>E. faecium</i> NA01 | <i>E. faecalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>L. lactis</i> <i>Listeria</i> spp. | 5 min. 100°C, pH 2,0-6,0 pH 2,0-6,0 | ND | Olasupo <i>et al.</i> (1994) |
| Bacteriocinas (14) | <i>E. faecium</i> | <i>Lb. plantarum</i> <i>L. lactis</i> <i>B. termosphacta</i> <i>Clostridium</i> spp <i>Ls. monocytogenes</i> | pH 4,5-7,0 | ND | Ben Embarek <i>et al.</i> (1994) |
| Bacteriocina | <i>E. faecium</i> 7C5 | <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>St. aureus</i> <i>Cl. tyrobutyricum</i> | 1 min. 72°C, pH 5,5 | ND | Torri Tarelli <i>et al.</i> (1994) |
| Bacteriocinas (2) | <i>E. faecium</i> RZSC5 <i>E. faecium</i> RZSC13 | <i>Listeria</i> spp. | 15 min. 121°C, pH 4,5 pH 4,5-6,5 | 2.500-3.000 Da | Vlaemynck <i>et al.</i> (1994) |
| Enterocina L50A Enterocina L50B | <i>E. faecium</i> L50 ^b | Bacterias Gram-positivas | 1,5 min. 121°C pH 4,5, 7,0 pH 2,0-11,0 | 5.190 Da (L50A) 5.178 Da (L50B) | Cintas (1995) Cintas <i>et al.</i> (1995) Cintas <i>et al.</i> (1998a,b) |

Tabla II.5. (continuación)

| Bacteriocina | Cepa productora | Espectro de acción | Termoestabilidad y tolerancia al pH | Tamaño molecular | Referencias |
|------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| Enterocina CRL35 | <i>E. faecium</i> CRL35 | <i>Listeria</i> spp. | ND | 3.000-4.000 Da | Farías <i>et al.</i> (1996) |
| Enterocina A | <i>E. faecium</i> CTC492 | <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>Listeria</i> spp. <i>Cl. perfringens</i> | 20 min. 121°C | 4.829 Da | Aymerich (1996) Aymerich <i>et al.</i> (1996) |
| Enterocina 900 | <i>E. faecium</i> BFE900 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lb. sake</i> <i>Listeria</i> spp. <i>Cl. butyricum</i> | 15 min. 121°C pH 2,0-10,0 | ND | Franz <i>et al.</i> (1996) |

^aLos autores no mencionan las condiciones experimentales empleadas. ^b*E. faecium* L50 se identificó inicialmente como *P. acidilactici* L50 y su bacteriocina se denominó pediocina L50 (Cintas, 1995; Cintas *et al.* 1995).

Tabla II.6. Bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus hirae*

| Bacteriocina | Cepa productora | Espectro de acción | Termoestabilidad y tolerancia al pH | Tamaño molecular | Referencias |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Enterocina LIQ4 | <i>E. faecalis</i> K4 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i> | 30 min. 80°C, pH 2,0 | < 2.000 Da | Kühnen <i>et al.</i> (1985) |
| Enterocina Bc-48 | <i>E. faecalis</i> AS-48 | <i>E. faecalis</i> | pH 5,5-10 | 80.000 Da | Lopez-Lara <i>et al.</i> (1991) |
| Bacteriocinas (3) | <i>E. faecalis</i> NRIC1140 <i>E. faecalis</i> NRIC1140 <i>E. faecalis</i> NRIC1140 | <i>Ls. monocytogenes</i> | ND | ND | Arihara <i>et al.</i> (1991) |
| Enterocina 226NWC | <i>E. faecalis</i> 226 | <i>E. faecalis</i> <i>Listeria</i> spp. | 30 min. 100°C | 5.800 Da | Villani <i>et al.</i> (1993) |
| Bacteriocinas (3) | <i>E. faecalis</i> X1 <i>E. faecalis</i> X2 <i>E. faecalis</i> X3 | <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>St. aureus</i> | 1 min. 72°C, pH 5,5 | ND | Torri Tarelli <i>et al.</i> (1994) |
| Enterocina EFS2 | <i>E. faecalis</i> EFS2 | <i>Lactococcus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>St. aureus</i> <i>Cl. tyrobutyricum</i> | 10 min. 100°C pH 4,5-9,0 | 7.000 Da | Ryser <i>et al.</i> (1994) Maisnier-Patin <i>et al.</i> (1996) |
| Enterocina 4* | <i>E. faecalis</i> INIA4 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>Cl. tyrobutyricum</i> | ND | 7.166 Da | Joosten <i>et al.</i> (1996) |

Tabla II.6. (continuación)

| Bacteriocina | Cepa productora | Espectro de acción | Termoestabilidad y tolerancia al pH | Tamaño molecular | Referencias |
|-----------------|--------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|
| Bacteriocina 31 | <i>E. faecalis</i> pYI17 | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i> | 10 min. 121°C | 4.400 Da | Tomita <i>et al.</i> (1996) |
| Hiraecina S | <i>E. hirae</i> | <i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. | 60 min. 100°C | ND | Siragusa (1992) |

* La enterocina 4 es idéntica al antibiótico AS-48 producido por *E. faecalis* AS-48 (Gálvez *et al.*, 1989; López-Lara *et al.*, 1991).

caracterizado molecularmente los genes que codifican su síntesis, lo que ha evidenciado la identidad de ambas sustancias (Piard *et al.*, 1993; Rince *et al.*, 1994).

Las lactococcinas son las otras bacteriocinas mejor caracterizadas del género y se diferencian de los lantibióticos porque no contienen aminoácidos modificados y poseen un espectro de acción mucho más reducido, generalmente limitado a microorganismos filogenéticamente próximos a la cepa o a la especie productora. Entre ellas se encuentran la lactococcina A producida por *L. cremoris* (Van Belkum *et al.*, 1989; Holo *et al.*, 1991), la lactococcina B producida por las especies *L. cremoris* y *L. lactis* (Van Belkum *et al.*, 1992; Venema *et al.*, 1993), la lactococcina M producida por *L. cremoris* (Van Belkum *et al.*, 1991a) y la lactococcina G producida por *L. lactis* (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). La lactococcina M (Van Belkum *et al.*, 1991a; Venema, 1995) y la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) se diferencian del resto de las lactococcinas porque su actividad biológica requiere la presencia simultánea de dos péptidos diferentes. Recientemente se ha descrito que la lactococcina A y la diplococcina presentan la misma estructura primaria (Venema, 1995; Nes *et al.*, 1995).

En lo que respecta al género *Pediococcus*, las especies *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* son las que presentan mayor capacidad bacteriocinogénica, caracterizándose sus bacteriocinas por la ausencia de aminoácidos modificados posttraduccionalmente y por mostrar amplios espectros de acción frente a bacterias Gram-positivas. La primera bacteriocina descrita fue la pediocina A, producida por *P. pentosaceus* FBB61 aislado de pepinillos en salmuera (Fleming *et al.*, 1975; Daeschel y Klaenhammer, 1985; Piva y Headon, 1994). Posteriormente, González y Kunka (1987) identificaron la pediocina PA-1, producida por *P. acidilactici* PAC-1.0 aislado de carne (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992). En ese mismo año, Bhunia *et al.* (1987) aislaron de un embutido crudo curado comercial, la cepa *P. acidilactici* H, que producía una bacteriocina, denominada pediocina AcH (Bhunja *et al.*, 1988). Posteriormente se han caracterizado molecularmente los genes que codifican la síntesis de la pediocina PA-1 (Marugg *et al.*, 1992) y de la pediocina AcH (Motlagh *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 1995) evidenciando que ambas sustancias son en realidad la misma bacteriocina. Recientemente se ha identificado una cepa de *Lb. plantarum*, aislada de queso *Munster*, que también produce la pediocina PA-1/AcH (Ennahar *et al.*, 1996). La pediocina PA-1/AcH es, junto a la nisina, la bacteriocina mejor caracterizada y la única empleada actualmente como bioconservante en la industria alimentaria (Vandenberg, 1993; Ray y Hoover, 1993).

La única especie de interés alimentario del género *Streptococcus* es *S. thermophilus*. Este microorganismo se emplea como cultivo iniciador en una gran variedad de quesos y, conjuntamente con *Lb. bulgaricus*, en la elaboración del yogur (Smith y Palumbo, 1981). Asimismo, Villani *et al.* (1995) aislaron de yogur comercial la cepa *S. thermophilus* 347 productora de termofilina 347, una bacteriocina con una potente actividad anti-*Listeria*. Recientemente se ha descrito la producción de termofilina 13, una bacteriocina con un amplio espectro de acción, por *S. thermophilus* SFi13 (Marciset y Mollet, 1993; Marciset *et al.*, 1997). En cuanto a las demás especies de este género, las bacteriocinas mejor caracterizadas son la estreptococcina A-FF22 producida por *S. pyogenes* FF22 (Tagg y Wannamaker, 1978; Hynes *et al.*, 1993) y la salivaricina A producida por *S. salivarius* 20P3 (Ross *et al.*, 1993).

La mayoría de las especies productoras de bacteriocinas del género *Leuconostoc* se han

aislado de productos cárnicos envasados al vacío, de diversos productos lácteos y de bebidas alcohólicas (vino y *sherry*) (Hastings y Stiles, 1991; Héchard *et al.*, 1992). Hasta el momento se han descrito más de 14 bacteriocinas en este género, siendo las mejores caracterizadas a nivel bioquímico y genético la leucocina A-UAL187 producida por *Lc. gelidum* A-UAL187 (Hastings y Stiles, 1991), la mesentericina Y105 producida por *Lc. mesenteroides* Y105 (Héchard *et al.*, 1992; Fremaux *et al.*, 1995) y la leucocina B-Talla producida por *Lc. carnosum* Talla (Felix *et al.*, 1994). Por otra parte, la leucocina S, producida por *Lc. paramesenteroides* OX, presenta un amplio espectro de acción, aunque aún no se ha caracterizado adecuadamente (Lewus *et al.*, 1992). Asimismo, es interesante destacar que Revol-Junelles *et al.* (1996) aislaron la cepa *Lc. mesenteroides* FR52 que produce las mesentericinas 52B y 52A, esta última con una secuencia aminoacídica idéntica a la mesentericina Y105.

II.3.2.3. Bacteriocinas de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*

Las primeras referencias bibliográficas sobre la producción de bacteriocinas por el género *Lactobacillus* datan de los años 60, cuando De Klerk y Coetzee (1961) analizaron 189 cepas de lactobacilos homo y heterofermentativos y observaron que, aproximadamente, el 6% producían sustancias bactericidas frente a otros miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Desde entonces se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas (*Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. amylovorus* y *Lb. helveticus*), heterofermentativas facultativas (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* y *Lb. sake*) y heterofermentativas obligadas (*Lb. fermentum*), muchas de ellas aisladas de productos cárnicos, encurtidos y bebidas. La lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983), la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994; Van der Vossen *et al.*, 1994), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995) y la acidocina J1132 (Tahara *et al.*, 1996) están producidas por diversas cepas de *Lb. acidophilus*; la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991a) por *Lb. johnsonii* (Fujisawa *et al.*, 1992); la lactobina A producida por *Lb. amylovorus* (Contreras *et al.*, 1997); la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986) y la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975) por *Lb. helveticus*; la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990) y la caseicina LHS (Dicks *et al.*, 1992) por *Lb. casei*; la curvacina A (Tichaczek *et al.*, 1992) por *Lb. curvatus*; las plantaricinas S y T (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995) y la plantaricina C (González *et al.*, 1994) por *Lb. plantarum*; la sakacina A (Schillinger y Lücke, 1989; Holck *et al.*, 1992), la sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1992), la bavaricina MN (Kaiser y Montville, 1996) y el lantibiótico lactocina S (Mortvedt y Nes, 1990; Mortvedt *et al.*, 1991; Skaugen *et al.*, 1994) por *Lb. sake* y, por último, la fermenticina 466 de *Lb. fermentum* (De Klerk y Smit, 1967). Recientemente, se han caracterizado molecularmente los genes que codifican la síntesis de las sakacinas P y 674, producidas por *Lb. sake* LTH673 y 674, respectivamente, evidenciando que ambas sustancias son la misma bacteriocina (Holck *et al.*, 1994a; Tichaczek *et al.*, 1994). Por otra parte, la bavaricina A, producida por *Lb. bavaricus* MI401 (Larsen *et al.*, 1993), presenta una secuencia aminoacídica idéntica a la de la sakacina P/674. Asimismo, Tichaczek *et al.* (1993) y Axelsson *et al.* (1993) han demostrado la identidad de la curvacina A y la sakacina A, producidas por *Lb. curvatus* LTH1174 y *Lb. sake* Lb706, respectivamente. En 1990, Daeschel *et al.* describieron el aislamiento y la capacidad bacteriocinogénica de *Lb. plantarum* C11 y, posteriormente, Nissen-Meyer *et al.* (1993a)

purificaron la bacteriocina, denominándola plantaricina A, y sugirieron que se trataba de un sistema de dos péptidos; sin embargo, estudios recientes han demostrado que la plantaricina A es la proteína responsable de la inducción de la síntesis de las plantaricinas EF, JK y N de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; 1996; Anderssen *et al.*, 1998).

Respecto al género *Carnobacterium*, Ahn y Stiles (1990a) y Schillinger y Holzapfel (1990) fueron los primeros en describir la producción de bacteriocinas por diversas cepas de las especies *C. piscicola*, *C. divergens* y *C. gallinarum*. Ahn y Stiles (1990b) aislaron una cepa de *C. piscicola* de carne envasada al vacío, identificada como *C. piscicola* LV17, que mostraba una intensa capacidad bacteriocinogénica asociada a la presencia de dos plásmidos, denominados pCP40 y pCP49. Posteriormente, estos autores realizaron ensayos de curación con esta cepa y aislaron dos mutantes, que denominaron LV17A (plásmido pCP49) y LV17B (plásmido pCP40) (Ahn y Stiles, 1992). La cepa mutante LV17A produce la carnobacteriocina A (Worobo *et al.*, 1994) y la cepa mutante LV17B produce las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1994). Por otra parte, Schillinger y Holzapfel (1990) aislaron 18 cepas de una colección de 37 *Carnobacterium* spp. que mostraban actividad inhibidora frente a otras carnobacterias. De ellas, destaca la cepa *C. piscicola* LV61, que produce la piscicolina 61 y es activa además frente a *Enterococcus* spp. y *Listeria* spp. Estudios a nivel molecular, han evidenciado que la piscicolina 61 y la carnobacteriocina A son la misma sustancia (Holck *et al.*, 1994b). Otras bacteriocinas de este género son la carnocina UI49, producida por *C. piscicola* UI49 aislado de filetes de pescado (Stoffels *et al.*, 1992a; 1992b), la piscicolina 126, producida por *C. piscicola* JG126 aislado de productos cárnicos (Jack *et al.*, 1996), las piscicocinas VIa y VIb, producidas por *Carnobacterium piscicola* VI aislado de filetes de pescado (Pilet *et al.*, 1995) y, por último, la divergicina A, producida por *C. divergens* LV13 aislado de carne envasada al vacío (Worobo *et al.*, 1995). Estudios a nivel molecular realizados recientemente pusieron de manifiesto que la piscicocina VIb es idéntica a la carnobacteriocina BMI (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996).

II.3.3. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

Klaenhammer (1993) propuso clasificar las bacteriocinas de las bacterias lácticas en 4 clases, atendiendo a su estructura y naturaleza química, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, estabilidad térmica y modo de acción:

Clase I: lantibióticos, bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5KDa) que contienen aminoácidos poco usuales y modificados postraduccionalmente.

Clase II: bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 KDa), termoestables, que no contienen aminoácidos modificados y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática. Las bacteriocinas de la clase II se dividen, a su vez, en los siguientes grupos:

- (IIa) péptidos que presentan en su extremo N-terminal la secuencia YGNGV (donde, Y, tirosina; G, glicina; N, asparragina y V, valina), denominada secuencia consenso, y que muestran una potente actividad inhibidora frente a *Listeria* spp.
- (IIb) bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes y que actúan mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana citoplasmática.
- (IIc) bacteriocinas tiol-activadas o péptidos que para ejercer su actividad antimicrobiana

requieren la presencia de residuos de cisteína reducidos, representadas únicamente por la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993).

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 KDa) y termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos de 60-100°C durante 10-15 min). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por especies del género *Lactobacillus* (Fremaux y Klaenhammer, 1993).

Clase IV: bacteriocinas complejas, constituidas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica.

Durante los últimos años se han caracterizado bioquímicamente y genéticamente nuevas bacteriocinas de las bacterias lácticas, la mayoría de ellas pertenecientes a la clase II, lo que ha dado lugar a la modificación de la clasificación establecida por Klaenhammer (1993). Recientemente, Nes *et al.* (1996) han propuesto una nueva clasificación de las bacteriocinas (Tabla II.7) en la cual se mantienen las clases I, II y III establecidas por Klaenhammer (1993) y se sugiere que se debe completar la caracterización bioquímica de las bacteriocinas constituidas aparentemente por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas (clase IV) antes de reconocerlas como una clase de bacteriocinas. En lo que respecta a las bacteriocinas de la clase II, por una parte, se excluye el grupo de las bacteriocinas tiol-activadas (grupo IIc; Klaenhammer, 1993), ya que los trabajos realizados por Venema *et al.* (1996a) han puesto de manifiesto que ni la presencia ni el estado reducido de los residuos de cisteína de la lactococcina B son esenciales para su actividad biológica. Por otra parte, estos autores proponen agrupar las bacteriocinas de la clase II en los siguientes grupos:

- (IIa) Bacteriocinas del tipo pediocina o péptidos que contienen la secuencia consenso (YNGNV) en su extremo N terminal y que muestran una potente actividad anti-*Listeria*.
- (IIb) Bacteriocinas que requieren para ser activas la presencia simultánea de dos péptidos diferentes.
- (IIc) Bacteriocinas secretadas a través de la ruta general de secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*) dependiente de un péptido señal (sistema *sec*-dependiente).

Atendiendo a esta clasificación, algunas bacteriocinas descritas recientemente y caracterizadas por ser bacteriocinas no antibióticos de pequeño tamaño molecular y termoestables (clase II), entre ellas la lactococcina B (Van Belkum *et al.*, 1991a; Venema *et al.*, 1995), la lactococcina A (Van Belkum *et al.*, 1991a; Holo *et al.*, 1991; Stoddard *et al.*, 1992), la carnobacteriocina A/Piscicolina 61 (Worobo *et al.*, 1994; Holck *et al.*, 1994b) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998b) no se pueden clasificar en ninguno de los grupos establecidos. Por otra parte, la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) es una bacteriocina del tipo pediocina que se secreta por el sistema *sec*-dependiente, por lo que podría clasificarse tanto en el grupo IIa como en el grupo IIc (Tabla II.7).

Las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II son las más extendidas entre las bacterias lácticas y, por lo tanto, las que han sido mejor caracterizadas durante los últimos años. Por otra parte, debido a sus características físico-químicas, son excelentes candidatos para ser empleados como bioconservadores en la industria alimentaria. Las bacteriocinas de ambas clases difieren claramente en lo que respecta a su estructura primaria y a la maquinaria necesaria para su síntesis

Tabla II.7. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

| Bacteriocinas | Microorganismo productor | Referencias |
|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| CLASE I (lantibióticos) | | |
| Nisina A | <i>L. lactis</i> | De Vuyst y Vandamme (1994c) |
| Nisina Z | <i>L. lactis</i> | De Vuyst y Vandamme (1994c) |
| Salivaricina A | <i>S. salivarius</i> 20P3 | Ross <i>et al.</i> (1993) |
| Estreptococcina A-FF22 | <i>S. pyogenes</i> FF22 | Jack <i>et al.</i> (1994) |
| Lacticina 481 (1) | <i>L. lactis</i> CNRZ481 | Piard <i>et al.</i> (1992) |
| Lactococcina DR (1) | <i>L. lactis</i> ADRIA85L030 | Dufour <i>et al.</i> (1991) |
| Carnocina UI49 | <i>C. piscicola</i> U149 | Stoffels <i>et al.</i> (1992b) |
| Lactocina S | <i>Lb. sake</i> L45 | Mortvedt <i>et al.</i> (1991) |
| CLASE II | | |
| Grupo IIa (tipo pediocina) | | |
| Pediocina PA1 (2) | <i>P. acidilactici</i> PAC-1.0 | Henderson <i>et al.</i> (1992) |
| Pediocina Ach (2) | <i>P. acidilactici</i> H | Bhunja <i>et al.</i> (1988) |
| Leucocina A-UAL187 | <i>Lc. gelidum</i> UAL187 | Hastings <i>et al.</i> (1991) |
| Mesentericina Y105 | <i>Lc. mesenteroides</i> Y105 | Hécharde <i>et al.</i> (1992) |
| Sakacina A (3) | <i>Lb. sake</i> LB706 | Holck <i>et al.</i> (1992) |
| Curvacina A (3) | <i>Lb. curvatus</i> LTH1174 | Tichaczek <i>et al.</i> (1992) |
| Sakacina P (4) | <i>Lb. sake</i> LTH673 | Tichaczek <i>et al.</i> (1992) |
| Sakacina 674 (4) | <i>Lb. sake</i> LB674 | Holck <i>et al.</i> (1994a) |
| Bavaricina A (4) | <i>Lb. bavaricus</i> MI401 | Larsen <i>et al.</i> (1993) |
| Acidocina A | <i>Lb. acidophilus</i> TK9201 | Kanatani <i>et al.</i> (1995) |
| Carnobacteriocina BM1 | <i>C. piscicola</i> LV17B | Quadri <i>et al.</i> (1994) |
| Carnobacteriocina B2 | <i>C. piscicola</i> LV17B | Quadri <i>et al.</i> (1994) |
| Enterocina A | <i>E. faecium</i> CTC492 | Aymerich <i>et al.</i> (1996) |
| Grupo IIb (sistemas de dos péptidos) | | |
| Lactococcina M (M/N) | <i>L. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum <i>et al.</i> (1991a) |
| Lactococcina G (G α /G β) | <i>L. lactis</i> LMG2081 | Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1992) |
| Lactacina F (Fa/Fx) | <i>Lb. johnsonii</i> VPI11088 | Allison <i>et al.</i> (1994) |
| Plantaricina S (α / β) | <i>Lb. plantarum</i> LCPO10 | Jiménez-Díaz <i>et al.</i> (1995) |
| Termofilina 13 (ThmA/ThmB) | <i>S. thermophilus</i> SFi13 | Marciset <i>et al.</i> (1997) |
| Plantaricinas EF y JK | <i>Lb. plantarum</i> C11 | Diep <i>et al.</i> (1996) |
| Acidocina J1132 (α / β) | <i>Lb. acidophilus</i> JCM1132 | Tahara <i>et al.</i> (1996) |

Tabla II.7. (continuación)

| Bacteriocinas | Microorganismo productor | Referencias |
|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Grupo IIc (sec-dependientes) | | |
| Acidocina B | <i>Lb. acidophilus</i> M46 | Leer <i>et al.</i> (1995) |
| Divergicina A | <i>C. divergens</i> LV13 | Worobo <i>et al.</i> (1995) |
| Bacteriocina 31 ^a | <i>E. faecalis</i> Y117 | Tomita <i>et al.</i> (1996) |
| Otras bacteriocinas^b | | |
| Lactococcinas A y B | <i>L. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum <i>et al.</i> (1991a) |
| | <i>L. lactis</i> WM4 | Stoddard <i>et al.</i> (1992) |
| | <i>L. cremoris</i> LMG2130 | Holo <i>et al.</i> (1991) |
| Carnobacteriocina A (5) | <i>C. piscicola</i> LV17A | Worobo <i>et al.</i> (1994) |
| Piscicolina 61 (5) | <i>C. piscicola</i> LV61 | Holck <i>et al.</i> (1994b) |
| Enterocinas L50A y L50B | <i>E. faecium</i> L50 | Cintas <i>et al.</i> (1998b) |
| CLASE III | | |
| Helveticina J | <i>Lb. helveticus</i> 481 | Joerger y Klaenhammer (1986) |
| Caseicina 80 | <i>Lb. casei</i> B80 | Rammelsberg <i>et al.</i> (1990) |

Las bacteriocinas con el mismo número entre paréntesis tienen idéntica secuencia aminoacídica; ^aEsta bacteriocina puede incluirse también en el grupo IIa; ^bBacteriocinas de la clase II que no se pueden incluir en ningún grupo.
Fuente Nes *et al.* (1996).

y procesamiento; no obstante, se han descrito algunas bacteriocinas de la clase I (lantibióticos), entre las que se incluyen la salivaricina A (Ross *et al.*, 1993), la estreptococcina A-FF22 (Hynes *et al.*, 1993) y la lacticina 481/ lactococcina DR (Piard *et al.*, 1993; Rince *et al.*, 1994), cuya secreción depende de los mismos mecanismos de procesamiento y transporte que los de las bacteriocinas de la clase II (Havarstein *et al.*, 1994; Havarstein *et al.*, 1995a).

II.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de síntesis ribosomal, la mayoría de ellas aún no bien caracterizadas, por lo que establecer unas características comunes a todas ellas es una tarea casi imposible. No obstante, a continuación se resumen sus principales propiedades físico-químicas (naturaleza, tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia, estabilidad al pH, etc...), espectro antimicrobiano y modo de acción. Asimismo, se revisan los mecanismos bioquímicos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción, así como, la organización molecular y la caracterización de los determinantes genéticos implicados en estos procesos.

II.4.1. Propiedades físico-químicas de las bacteriocinas

Aunque por definición las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica, se han descrito algunas que presentan en su molécula componentes glucídicos y/o lipídicos, además de una fracción proteica. Así, por ejemplo, la leucocina S (Lewus *et al.*, 1992) y la lactocina 27 (Upreti, 1994) son glicoproteínas; la mesenterocina 52 (Sudirman *et al.*, 1994) es de naturaleza lipoproteica y la fermenticina (De Klerk y Smit, 1967) es un complejo glucolipoproteico. No obstante, estas conclusiones se obtuvieron empleando bacteriocinas parcialmente purificadas por lo que, hasta que estas bacteriocinas se purifiquen a homogeneidad, no se puede asegurar que su actividad biológica requiera la presencia de las fracciones glucídicas y/o lipídicas. En este contexto, Jiménez-Díaz *et al.* (1993) sugirieron la presencia de una fracción glucolipídica en la plantaricina S; sin embargo, estos autores descartaron posteriormente esta hipótesis al purificar a homogeneidad esta bacteriocina por cromatografía de fase reversa y obtener dos péptidos que mantenían su actividad biológica (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995).

Los lantibióticos constituyen una clase especial de bacteriocinas caracterizadas por presentar en su composición aminoácidos poco usuales y modificados posttraducionalmente, como la dehidroalanina (Dha), la dehidrobutirina (Dhb), la lantionina o la β -metil-lantionina. Los aminoácidos Dha y Dhb proceden de la deshidratación de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de Dha o Dhb con residuos de cisteína, mediante enlaces tioéter, origina los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina, respectivamente. Dentro de este grupo se incluyen, entre otras, la nisina A y Z (De Vuyst y Vandamme, 1994c), la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1992; 1993), la estreptococcina A-FF22 (Jack *et al.*, 1994), la salivaricina A (Ross *et al.*, 1993), la lactocina S (Skaugen, 1994; Skaugen *et al.*, 1997), la carnocina UI 49 (Stoffels *et al.*, 1992b) y, probablemente, la plantaricina C (González *et al.*, 1994).

El resto de las bacteriocinas de las bacterias lácticas carecen de aminoácidos modificados

posttraduccionalmente, por lo que, de forma general, se denominan bacteriocinas no lantibióticos. Atendiendo al contenido en cisteína que presentan en su composición aminoacídica, se pueden establecer los siguientes grupos: (i) cistibióticos, bacteriocinas que presentan dos o más residuos de cisteína entre los que se establecen puentes disulfuro y que incluyen la pediocina PA-1/AcH, con dos puentes disulfuro establecidos entre las posiciones 9-14 y 24-44 (Henderson *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1992; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997) y la leucocina A-UAL187, con un puente disulfuro entre las posiciones 9 y 14 (Hastings *et al.*, 1991); otras bacteriocinas con posibilidad de formar puentes disulfuro son la mesentericina Y105, las sakacinas A y P, la lactacina F, las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 (Jack *et al.*, 1995) y la enterocina A (Aymerich, 1996); (ii) tiolibióticos, bacteriocinas que contienen un solo residuo de cisteína y que para ser activas requieren que esté en su forma reducida (en este grupo se incluyó inicialmente la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993; 1996a) y (iii) bacteriocinas que carecen de residuos de cisteína, entre las que se encuentran las lactococcinas A, M y G (Van Belkum *et al.*, 1991a; Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Jack *et al.* (1995) propusieron emplear el contenido en cisteína como un criterio para diferenciar el espectro de acción de las bacteriocinas, basándose en el hecho de que el enlace tiol establecido entre los residuos de cisteína podría tener un papel similar a la activación de los grupos tiol de las toxinas de las bacterias Gram-negativas; así, pues, diferenciaron un espectro de acción amplio para las bacteriocinas con dos puentes disulfuro, intermedio para las bacteriocinas que contienen dos residuos de cisteína y reducido para aquéllas que carecen de cisteína o contienen un único residuo. Por otra parte, dentro de las bacteriocinas no lantibióticos, se pueden establecer otro grupo, constituido por aquellas que para ser activas requieren la presencia simultánea de dos péptidos, como, entre otras, la lactococcina M (Van Belkum *et al.*, 1991a), la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), la lactacina F (Allison *et al.*, 1994), la plantaricina S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995), la acidocina J1132 (Tahara *et al.*, 1996), las plantaricinas EF y JK (Diep *et al.*, 1996; Anderssen *et al.*, 1998), la lactobina A (secuencia similar a la lactacina F) (Contreras *et al.*, 1997), la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998b). La actividad antimicrobiana de la lactococcina G y de la lactococcina M requiere la presencia simultánea de ambos péptidos (G α -G β y M-N, respectivamente), ya que ninguno de ellos posee actividad antimicrobiana por sí mismo; sin embargo, en el caso de la lactacina F, la lactobina A, la plantaricina S, las plantaricinas EF y JK, la termofilina 13 y las enterocinas L50A y L50B, uno o los dos péptidos del sistema posee actividad antimicrobiana de forma independiente, si bien la presencia simultánea de ambos produce un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana.

En lo que respecta al tamaño molecular de las bacteriocinas, los lantibióticos son péptidos pequeños que contienen entre 19 y 37 residuos aminoacídicos, es decir entre 1.959 y 4.000 dáltones (Da), aproximadamente. La carnocina UI49, con una tamaño molecular de 4.635 Da (Stoffels *et al.*, 1992a), es el lantibiótico de mayor tamaño caracterizado hasta el momento (Nes y Tagg, 1996). Por otra parte, dentro de las bacteriocinas no lantibióticos se pueden establecer dos grupos (Klaenhammer, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994b): (i) péptidos pequeños, con un tamaño molecular inferior a 10.000 Da, entre los que se incluyen la diplococcina (Davey y Richardson, 1981), la lactococcina A (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991a), la lactocina

27 (Upreti, 1994), la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991a; 1991b), la sakacina A/curvacina A (Holck *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992), la sakacina P/674/bavaricina A (Tichaczek *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1993; Holck *et al.*, 1994a; Tichaczek *et al.*, 1994), la pediocina AcH/PA-1 (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Motlagh *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992; Nieto Lozano *et al.*, 1992), la leucocina A-UAL187 (Hastings *et al.*, 1991), la enterocina A (Aymerich, 1996, las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998b) y (ii) proteínas con un tamaño molecular superior a 30.000 Da, como, por ejemplo, la helveticina J (Joerger y Klaenhammer 1986; 1990) y la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990).

La mayoría de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular son catiónicas (a pH 7), hidrófobas y presentan un elevado punto isoeléctrico (Jack *et al.*, 1995). Otra característica observada entre numerosas bacteriocinas no lantibióticos de pequeño tamaño molecular es la presencia en su extremo N terminal de la secuencia consenso YGNGV (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Quadri *et al.*, 1994; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996). Las bacteriocinas que presentan esta secuencia se denominan bacteriocinas del tipo pediocina, por ser la pediocina PA-1/AcH la primera descrita y la mejor caracterizada, y destacan por ejercer una gran actividad anti-*Listeria* (Nes *et al.*, 1996). Entre las bacteriocinas del tipo pediocina mejor caracterizadas hasta el momento se incluyen, además de la pediocina AcH/PA-1 (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Motlagh *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992; Nieto Lozano *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992), la leucocina A-UAL187 (Hasting y Stiles, 1991), la mesentericina Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), la sakacina A/curvacina A (Holck *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992), la sakacina P/674/bavaricina A (Tichaczek *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1993; Holck *et al.*, 1994a; Tichaczek *et al.*, 1992), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1994), la enterocina A (Aymerich, 1996) y la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) (Tabla II.7). Otras bacteriocinas del tipo pediocina son las piscicocinas V1a y V1b, esta última idéntica a la carnobacteriocina BM1 (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996), la piscicolina 126 (Jack *et al.*, 1996), la bavaricina MN (Kaiser y Montville, 1996) y la enterocina CRL35 (Farías *et al.*, 1996).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se caracterizan por ser generalmente estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a las condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras (Cintas, 1995). La nisina y las lactostrepcinas son, sin embargo, extremadamente sensibles a este parámetro; la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece de un pH óptimo de 2,0 a un pH de 6,0, inactivándose reversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981); las lactostrepcinas son estables y activas a valores de pH entre 4,2 y 5,0 y se inactivan reversiblemente a pH 7,0 y 8,0 (Kozak *et al.*, 1978). Resultados similares se han descrito para la plantaricina C (González *et al.*, 1994), leucocina A-UAL-87 (Hastings *et al.*, 1991) y enterocina 1146 (Parente y Hill, 1992b). Por otra parte, la mayoría de las bacteriocinas descritas son activas en un amplio rango de pH (Cintas, 1995), generalmente entre valores de 3,0- 9,0, como, por ejemplo, la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1990), la caseicina 80 (Rammelsberg y Radler, 1990), las enterocinas JBL1061, JBL1083 y JBL1351 (Arihara *et al.*, 1993), la carnocina U149 (Stoffels *et al.*, 1992a) y la pediocina PA-1/AcH (Bhunia *et al.*, 1988). La tolerancia a valores de pH aún más extremos, entre 1,0-2,0 y 10,0-11,0, se ha descrito para la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994) y la

bavaricina A (Larsen *et al.*, 1993).

La termorresistencia es una característica muy extendida entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas, si bien, depende de una serie de factores como, entre otros, el grado de purificación de las bacteriocinas, la presencia de moléculas termoprotectoras y el pH (Tagg *et al.*, 1976). La resistencia de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas al autoclavado y a los tratamientos a 100 y a 121°C empleando sobrenadantes libres de células es una característica muy generalizada (Cintas, 1995). No obstante, la termoestabilidad disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente o a homogeneidad, como se ha comprobado con la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), la carnocina U-149 (Stoffels *et al.*, 1992a) y la sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1992), entre otras. La nisina purificada, sin embargo, se caracteriza por su elevada termoestabilidad a un pH de 2,0, permaneciendo activa tras su calentamiento a 100°C durante 10 min. (Hurst, 1981). En la bibliografía se han descrito algunas bacteriocinas, en su mayor parte producidas por lactobacilos, muy inestables a los tratamientos térmicos, aún sin estar purificadas, como es el caso de la caseicina 80 (Rammelsberg y Radler, 1990), la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986) y la enterocina 01 (Olasupo *et al.*, 1994). La termoestabilidad de las bacteriocinas, al igual que sucede con otras proteínas, está íntimamente relacionada con el pH; así, pues, se han descrito numerosas bacteriocinas que son más termorresistentes a pH ácido, como, por ejemplo, la leucocina A-UAL-187 (Hastings *et al.*, 1991), la mesentericina Y05 (Hécharde *et al.*, 1992), las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995) y la enterocina 1146 (Parente y Hill, 1992b).

II.4.2. Purificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias que se liberan al medio exocelular por lo que, generalmente, el primer paso para su purificación consiste en la obtención y concentración del sobrenadante libre de células (Muriana y Luchansky, 1993; Venema *et al.*, 1997). Algunas bacteriocinas se encuentran en su estado nativo en forma de complejos macromoleculares o agregados inespecíficos de elevado tamaño molecular (30-300 KDa) que pueden enmascarar total o parcialmente su actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación, así como inducir a errores en la determinación de su tamaño molecular; concretamente, las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular y naturaleza altamente apolar interaccionan fácilmente con el material extracelular de las células lisadas (fragmentos de la pared celular y micelas de los ácidos lipoteicos) o con otros componentes apolares del medio de cultivo (ej. lípidos y ácidos grasos del agente tensoactivo no iónico Tween 80) (Muriana y Klaenhammer, 1991a; Mortvedt *et al.*, 1991; Contreras *et al.*, 1997). En estos casos, los complejos macromoleculares se pueden disgregar mediante el empleo de agentes disociantes como la urea o el SDS (Muriana y Klaenhammer, 1991a; González *et al.*, 1994), por ultrafiltración (Muriana y Klaenhammer, 1987) o eliminando el material lipídico mediante extracciones con metanol-cloroformo o etanol-dietiléter (Contreras *et al.*, 1997). Una vez recuperadas las bacteriocinas del sobrenadante, éstas se pueden concentrar mediante técnicas que permitan la separación de las diversas fracciones en función de su tamaño y/o naturaleza química, siendo las más empleadas (i) la filtración mediante diálisis (Schillinger y Lücke, 1989; Parente y Hill, 1992) o ultrafiltración (Muriana y Klaenhammer, 1991a; Ten Brink *et al.*, 1994); (ii) la precipitación de las proteínas empleando sales, como el sulfato amónico

(Holo *et al.*, 1991), o ácidos (Hastings *et al.* 1991) y (iii) la extracción de las proteínas con solventes orgánicos, como el butanol y el etanol (Piva y Headon, 1994). Asimismo, la concentración se puede realizar mediante desecación a vacío o liofilización; no obstante, esta técnica no elimina los componentes del medio de cultivo ni aquéllos que puedan interferir posteriormente la purificación (Schillinger y Lücke, 1989). El proceso de concentración, aunque es necesario para reducir el volumen inicial de trabajo y recuperar las bacteriocinas del medio de cultivo, no es muy selectivo, por lo que para obtener bacteriocinas con un alto grado de pureza, las muestras se han de someter a otras técnicas que permitan separar las bacteriocinas de las restantes fracciones proteicas en base a sus propiedades y características físico-químicas.

Considerando que la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas son péptidos de pequeño tamaño molecular, catiónicos (a pH 7,0) e hidrófobos, el grupo de investigadores del Laboratorio de Tecnología Genética Microbiana (LMG) de la Universidad Agrícola de Noruega (NLH, Aas, Noruega) diseñó, bajo la dirección del Prof. Dr. Ingolf F. Nes, el siguiente protocolo para su purificación a homogeneidad: (i) precipitación de las proteínas con sulfato amónico, (ii) cromatografía de intercambio catiónico, (iii) cromatografía de interacción hidrofóbica y (iv) cromatografía de fase reversa en un sistema de FPLC (del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*). Posteriormente, este protocolo ha sido aplicado con éxito para la purificación a homogeneidad de un gran número de bacteriocinas como, entre otras, la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), la pediocina PA-1 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a), la sakacina P y la curvacina A (Tichaczek *et al.*, 1992), la bavaricina A (Larsen *et al.*, 1993), las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998a,b) y los lantibióticos nisina A (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) y carnocina UI49 (Stoffels *et al.*, 1992b). Un protocolo similar en el que se incluye la cromatografía de filtración en geles ha sido empleado exitosamente para la purificación del lantibiótico lactocina S (Mortvedt *et al.*, 1990; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) y de sistemas de dos péptidos, como la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991a) y la plantaricina S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995). Hastings *et al.* (1991) propusieron un protocolo similar que incluye (i) precipitación de las proteínas con HCl 12N, (ii) cromatografía de interacción hidrofóbica, (iii) cromatografía de filtración en gel y (iv) cromatografía de fase reversa en un sistema de HPLC (del inglés, *High Pressure Liquid Chromatography*). Estos autores observaron que el empleo de cromatografía de intercambio catiónico y diálisis, así como de condiciones de alcalinidad, reducían considerablemente la actividad durante el proceso de purificación de la leucocina A-UAL187. El grupo dirigido por el Prof. Gerald Venema (Groningen, Países Bajos) propuso un protocolo de purificación empleando una metodología que excluye el uso de columnas cromatográficas y que se realiza en tres pasos: (i) precipitación de las bacteriocinas con etanol enfriado, (ii) isoelectroenfoque y (iii) ultrafiltración. Venema *et al.* (1997) purificaron la lactococcina A y la pediocina PA-1 con este protocolo y lograron una recuperación del 41 y 30%, respectivamente.

Por otra parte, Yang *et al.* (1992) desarrollaron una metodología basada en la capacidad de las bacteriocinas de adsorberse inespecíficamente a otras bacterias Gram-positivas, incluidos los microorganismos productores. La adsorción de las bacteriocinas se produce eficientemente en células inactivadas por calor y es máxima a valores de pH cercanos a la neutralidad (6,0), consiguiéndose su liberación a pH 2,0. Una vez obtenida la suspensión con las bacteriocinas,

ésta se dializa, se concentra por liofilización y se aplica a una columna de fase reversa en un sistema de HPLC. Yang *et al.* (1992) purificaron la pediocina PA-1, la leucocina Lcm1, la nisina y la sakacina A, obteniendo una recuperación al final del proceso de 106, 96,2, 93,3 y 44,3%, respectivamente. Posteriormente, otros autores han empleado esta metodología para la purificación de la pediocina UL5 (idéntica a la pediocina PA-1/AcH) (Daba *et al.*, 1994), las mesentericinas 52A (idéntica a la mesentericina Y105) y 52B (Revol-Junelles *et al.*, 1996) y la pediocina AcM (Elegado *et al.*, 1997), aunque sus rendimientos fueron menores que los obtenidos por Yang *et al.* (1992).

II.4.3. Espectro de acción de las bacteriocinas

La heterogeneidad en el espectro antimicrobiano de las bacteriocinas de las bacterias lácticas permite clasificarlas en tres grupos: (i) bacteriocinas con espectro de acción reducido y limitado a otras cepas de la especie del microorganismo productor, como la lactococcina A (Holo *et al.*, 1991) o la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990), o bien a otras especies de su mismo género, como la lactocina 27 (Upreti, 1994) y la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983); (ii) bacteriocinas con espectros de acción intermedios que inhiben además a otros géneros de bacterias lácticas y a bacterias Gram-positivas como, entre otras, especies de los géneros *Listeria*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. En este grupo se encuentran la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1987), la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1990), la plantaricina C (González *et al.*, 1994) y las plantaricinas S y T (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993), entre otras, y (iii) bacteriocinas de amplio espectro de acción que inhiben a un gran número de bacterias Gram-positivas entre las que se incluyen, además de las anteriores, especies de los géneros *Propionibacterium* y *Bacillus*. En este grupo se incluyen la nisina A y Z, que también inhiben la germinación de las esporas de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. (Hurst, 1981; Harris *et al.*, 1992; Vandenberg, 1993), la pediocina AcH/PA-1 (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Henderson *et al.*, 1992), la leucocina S (Lewus *et al.*, 1991) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1995; 1998a). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas purificadas a homogeneidad no inhiben el desarrollo de las bacterias Gram-negativas bajo condiciones normales; es decir, sin la presencia de agentes químicos o condiciones de pH que dañen la integridad de la pared celular (Kalchayanand *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1991).

En los últimos años se ha observado que las bacteriocinas del tipo pediocina se caracterizan por su potente actividad antimicrobiana frente a bacterias del género *Listeria*. Entre estas bacteriocinas anti-*Listeria* destacan la pediocina PA-1/AcH (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Pucci *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 1992), producida por diversas cepas de *P. acidilactici*; la leucocina A-UAL187 (Hasting y Stiles, 1991) y la mesentericina Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), producidas por *Leuconostoc* spp.; la sakacina A (Holck *et al.*, 1992), la sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1994) y la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995) producidas por *Lactobacillus* spp.; las carnobacteriocinas BM1y B2 producidas por *Carnobacterium* spp. (Quadri *et al.*, 1994) y la enterocina A (Aymerich, 1996), producida por *Enterococcus faecium* CTC492.

II.4.4. Modo de acción de las bacteriocinas

La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas actúan de modo bactericida frente a

los microorganismos sensibles, aunque se han descrito algunas, como la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), la leucocina A-UAL187 (Hastings y Stiles, 1991) y la leucocina S (Lewus *et al.*, 1992) que ejercen un modo de acción bacteriostático. La actividad bactericida de las bacteriocinas puede ir acompañada de la lisis celular del microorganismo sensible (bacteriocinas bacteriolíticas), como sucede con la nisina A (Bierbaum y Sahl, 1991), la plantaricina C (González *et al.*, 1994) y la enterocina EFS2 (Maisnier-Patin, 1996). Las bacteriocinas cuya acción bactericida no causa lisis celular son las más numerosas, incluyéndose entre ellas las lactostrepcinas (Kozak *et al.*, 1978), la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1990), la lactococcina A (Van Belkum *et al.*, 1991b), la lacticina B (Barefoot y Klaenhamer, 1983), la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994), la plantaricina S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993), la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la sakacina P (Schillinger y Lücke, 1989), la enterocina 226NWC (Villani *et al.*, 1993), las 3 bacteriocinas producidas por *E. faecium* JBL1061, JBL1083 y JBL1351 (Arihara *et al.*, 1993), la enterocina 900 (Franz *et al.*, 1996) y la enterocina A (Aymerich, 1996).

La pared celular de las bacterias Gram-positivas permite la entrada de moléculas relativamente grandes, de modo que parece poco probable que las bacteriocinas necesiten la presencia de receptores específicos análogos a los receptores de las colicinas, localizados en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Jack *et al.*, 1995). Parece ser que el mecanismo inicial de contacto de las bacteriocinas con las células sensibles se produce a través de una interacción inespecífica con los polímeros superficiales aniónicos (ácidos teicoicos o lipoteicoicos) presentes de forma general en la pared celular de las bacterias Gram-positivas (Bhunia *et al.*, 1991; Abee, 1995; Jack *et al.*, 1995). Algunos autores postulan que tras este primer contacto electrostático no específico las bacteriocinas no lantibióticos, concretamente la lactococcina A, requieren la presencia de receptores específicos en la membrana citoplasmática (Van Belkum *et al.*, 1991b). Por el contrario, ensayos realizados con la pediocina PA-1 sobre liposomas de *Ls. monocytogenes* y células sensibles de este microorganismo, así como otros experimentos similares realizados con la mesentericina Y105 y la termofilina 13, han puesto de manifiesto que, al igual que sucede en el caso de los lantibióticos, no es necesaria la presencia de receptores específicos (Kordel *et al.*, 1989; Jack *et al.*, 1995; Maftah *et al.*, 1993; Marciset *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997).

Las bacteriocinas de las bacterias Gram-negativas, concretamente las colicinas, actúan sobre las células sensibles estableciendo la formación de canales iónicos y/o ejerciendo una actividad nucleásica (Pugsley, 1984b). Diversos estudios de membrana y transporte activo realizados con bacteriocinas de las bacterias lácticas, así como estudios predictivos topológicos a partir de sus secuencias aminoacídicas, concretamente con la lactococcina A (Van Belkum *et al.*, 1991b), la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993), la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), la lacticina F (Abee *et al.*, 1994b), la acidocina J1132 (Tahara *et al.*, 1996), la acidocina J1229 (Tahara y Kanatani, 1996), la bavaricina MN (Kaiser y Montville, 1996), la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997), la pediocina PA-1 (Bhunia *et al.*, 1991; Chikindas *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997) y la nisina A/Z (Gao *et al.*, 1991; García-Garcera *et al.*, 1993; Abee *et al.*, 1994a) permiten hipotetizar que las bacteriocinas son proteínas activas a nivel de membrana cuyo mecanismo de acción primario es la formación de poros o canales iónicos en la membrana citoplasmática de las células sensibles (Abee, 1995). La composición y disposición de los fosfolípidos de membrana

(ej. composición de las cabezas polares y de las cadenas hidrocarbonadas) influye significativamente en la eficacia de la asociación de las bacteriocinas con la membrana citoplasmática, en su inserción en la misma y en la consiguiente formación del poro (Abee, 1995). En este contexto, se ha demostrado que la nisina A de *L. lactis* se asocia a fosfolípidos cargados negativamente y a liposomas no energizados que los contienen, lo que indica que la interacción electrostática entre los tres residuos catiónicos de lisina de la bacteriocina y los fosfolípidos aniónicos, como el fosfatidilglicerol (PG) y/o el difosfatidilglicerol (cardiolipina), contribuyen, junto con las interacciones hidrofóbicas, a la unión de la nisina a la membrana citoplasmática (García-Garcerá *et al.*, 1993; Abee, 1995; Driessen *et al.*, 1995). Por esta razón, la eficacia de la nisina A en la formación de poros disminuye en presencia de cationes di- y trivalentes (ej. Mg^{+2} , Ca^{+2} y Gd^{+3}), ya que éstos neutralizan la carga negativa de las cabezas polares de los fosfolípidos aniónicos, lo que induce, a su vez, la condensación de los fosfolípidos y, por tanto, un aumento de la rigidez de la membrana citoplasmática. Resultados similares se han obtenido con la lactacina F de *Lb. johnsonii* VPI11088 (Abee *et al.*, 1994b). Por otra parte, la disposición de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos influye en la fluidez de la membrana citoplasmática y, por tanto, en la eficacia de estas bacteriocinas en la formación de los poros (Abee *et al.*, 1994a,b; Abee, 1995). En este contexto, se ha demostrado que la eficacia antimicrobiana de la lactacina F frente a *E. faecalis* disminuye al descender la temperatura ya que aumenta la ordenación, y por tanto la rigidez, de la membrana citoplasmática, lo que dificultaría la inserción de las moléculas de bacteriocina y, por consiguiente, disminuiría la probabilidad de formación de los poros (Abee *et al.*, 1994b).

Las bacteriocinas poseen secuencias aminoácídicas que permiten la formación de láminas β y hélices α , estructuras secundarias características de proteínas que establecen interacciones con la membrana citoplasmática. El modelo de predicción topológica propuesto por Ocjius y Young (1991) consiste en la formación de estructuras anfifílicas multiméricas en forma de barril constituidas por un número indeterminado de bacteriocinas integradas y estabilizadas en la membrana por sus hélices α transmembrana. En primer lugar se integran en la membrana las estructuras helicoidales transmembrana de cada una de las moléculas peptídicas (monómeros) y, seguidamente, agregan y se forma el barril, en el que las partes hidrofílicas se exponen hacia el interior y las hidrofóbicas hacia la membrana celular. Cuando se han agregado suficientes péptidos, la repulsión electrostática que se crea entre sus cargas positivas parece ser la fuerza impulsora de la apertura del poro o canal. En el modelo propuesto por Driessen *et al.* (1995) para la nisina, los monómeros se asocian primero en la superficie de la membrana citoplasmática y, seguidamente, se insertan en la bicapa lipídica formando el poro; debido a las atracciones electrostáticas entre las cabezas aniónicas de los fosfolípidos y los aminoácidos catiónicos de la bacteriocina, aquéllas se introducen también y rodean externamente al poro en toda su longitud. La formación de los canales iónicos, con la consiguiente desestabilización de la integridad de la membrana, provoca un flujo pasivo de pequeñas moléculas, tales como iones (potasio, fosfato), aminoácidos y ATP, a través de su bicapa lipídica, con lo que se produce además una reducción o disipación del potencial de membrana (Sahl, 1991). Los bajos niveles de ATP intracelular y la carencia de iones y cofactores producen la inhibición de la síntesis de macromoléculas tales como el ADN, el ARN, las proteínas y los polisacáridos, lo que unido a la imposibilidad de mantener

el transporte activo de nutrientes conllevaría al cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, a la muerte celular (Koninsky, 1982). Algunos autores sugieren que la lisis de los microorganismos sensibles producida por las bacteriocinas bacteriolíticas podría deberse a la liberación de enzimas autolíticos que en condiciones normales están ligados electrostáticamente a los polímeros superficiales aniónicos (ácidos teicoicos o lipoteicoicos) de la pared celular (Jack *et al.*, 1995; Bierman y Sahl, 1991). Alternativamente, los canales pueden provocar la entrada de agua en el interior celular y, consecuentemente, la lisis por choque osmótico (Ocjius y Young, 1991). Los lantibióticos necesitan un mínimo de energía para la formación de los canales (Jack *et al.*, 1995; Abee *et al.*, 1994a; Abee, 1995); la nisina, por ejemplo, requiere para ser activa que las membranas de las células sensibles tengan un potencial de membrana negativo en el interior celular y/o que exista un gradiente de pH (alcalino en el interior celular) (Ruhr y Sahl, 1985; Gao *et al.*, 1991; García-Garcerá *et al.*, 1993; Abee *et al.*, 1994a). Por el contrario, las bacteriocinas no lantibióticas, entre ellas, la lactococcina A (Van Belkum *et al.*, 1991b), la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993), la leuconocina S (Bruno y Montville, 1993), la mesentericina Y105 (Maftah, *et al.*, 1993), la pediocina PA-1 (Bhunia *et al.*, 1991; Chikindas *et al.*, 1993; Yuhuan *et al.*, 1997) y la lactacina F (Abee *et al.*, 1994b) ejercen su acción antimicrobiana independientemente del potencial de membrana.

II.4.5. Inmunidad y resistencia

Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas poseen un mecanismo especial de defensa (inmunidad) que les protege de la toxicidad de sus propias bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976; Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995). Este mecanismo depende principalmente de una proteína de inmunidad específica de cada bacteriocina, la cual se expresa concomitantemente a la misma pero no requiere el sistema de procesamiento y transporte necesario para la liberación al medio exocelular de la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996). No obstante, se ha sugerido que la inmunidad podría estar mediada también por la acción de proteasas intracelulares que inactivarían la bacteriocina en las células productoras (Abee, 1995; Jack *et al.*, 1995; Allison y Klaenhammer, 1996).

El análisis genético de las hipotéticas proteínas de inmunidad descritas hasta la fecha permite generalizar que se trata de péptidos pequeños, constituidos aproximadamente por 51-154 aa, con un elevado punto isoeléctrico (pI) y que poseen generalmente dominios hidrofóbicos, lo que sugiere su localización en la membrana plasmática (Fremaux *et al.*, 1993). Las proteínas de inmunidad asociadas a las bacteriocinas constituidas por un sistema de dos péptidos contienen 110-154 aa y presentan entre 3 y 5 hélices α transmembrana (Fremaux *et al.*, 1993; Van Belkum *et al.*, 1991a), mientras que las del resto de las bacteriocinas son menores (51-113 aa) y poseen únicamente 1-2 hélices α transmembrana o carecen de ellas (Marugg *et al.*, 1992; Nissen-Meyer *et al.*, 1993b; Van Belkum *et al.*, 1992; Axelsson y Holck, 1995; Quadri *et al.*, 1995a; Quadri *et al.*, 1995b; Diep, 1996; Tomita *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1997b). Hasta la fecha, las proteínas de inmunidad asociadas a la lactococcina A (LciA) y a la carnobacteriocina B2 (CbiB2) son las únicas que ha sido purificadas a homogeneidad y caracterizadas genéticamente (Van Belkum *et al.*, 1991a; Stoddard *et al.*, 1992; Nissen-Meyer *et al.*, 1993b; Quadri *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995a; Quadri *et al.*, 1997b). En 1995, Abee propuso que las proteínas

de inmunidad interaccionan con las moléculas de bacteriocina libres en el medio extracelular, impidiendo de este modo su adsorción a la superficie celular y el consiguiente establecimiento de los poros; no obstante, experimentos bioquímicos realizados con las proteínas de inmunidad de la lactococcina A (Venema *et al.*, 1994; Venema, 1995) y de la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1995a) permiten descartar este modelo ya que estas proteínas no actúan desde el exterior celular. La LciA está constituida por 98 aa, no presenta modificaciones posttraduccionales y se localiza tanto en la membrana celular como intracelularmente. El análisis informático de su secuencia aminoacídica reveló que la región comprendida entre los residuos 29 y 47 es muy hidrófoba y puede constituir una hélice α transmembrana. De acuerdo con el modelo propuesto por Venema *et al.* (1994), esta hélice α interacciona con una proteína transmembrana (posiblemente el receptor de la lactococcina A) y se inserta en la membrana citoplasmática, quedando el extremo N-terminal de la LciA en el citoplasma y su extremo C-terminal en el exterior. Mediante su unión al receptor, la LciA previene la inserción de la lactococcina A en la membrana y, por tanto, impide que la bacteriocina ejerza su acción antimicrobiana. La fracción de LciA localizada en el interior celular constituiría un reservorio desde el que las moléculas se dirigirían a la membrana al tener lugar la síntesis de nuevas moléculas del receptor (Venema, 1995). No obstante, el modelo propuesto es meramente teórico ya que aún no se han identificado los receptores específicos de la lactococcina A (Nes *et al.*, 1996). Otros modelos sugieren que las proteínas de inmunidad interaccionan con las moléculas de bacteriocina que se encuentran formando los poros, por lo que estos se desestabilizan y/o sellan (Abee, 1995).

El concepto de inmunidad como un sistema que permite a las células productoras sobrevivir en presencia de su propia bacteriocina se debe diferenciar del concepto de resistencia o tolerancia de un microorganismo a una bacteriocina determinada. El mecanismo de resistencia bacteriana a las bacteriocinas no se ha elucidado aún, pero puede deberse a la pérdida o modificación de los receptores específicos de dicha bacteriocina, a variaciones en la fluidez de la membrana citoplasmática o a la síntesis de una proteína de resistencia (Klaenhammer, 1993). En este contexto, se ha descrito que mutantes espontáneos de *Ls. monocytogenes* resistentes a la nisina contienen un elevado porcentaje de cadenas hidrocarbonadas lineales y muy pocas cadenas ramificadas, lo que da lugar a una menor fluidez de la membrana citoplasmática y, por lo tanto, a una menor eficacia antimicrobiana de la bacteriocina (Abee *et al.*, 1994a; Abee, 1995). Asimismo, se ha observado la capacidad de diversos microorganismos resistentes a la nisina de sintetizar un enzima reductasa, denominado nisinasa, que destruye a esta bacteriocina (Harris *et al.*, 1992).

II.4.6. Biosíntesis de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas en forma de prepro péptidos biológicamente inactivos (preprobacteriocinas) (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). Estos precursores contienen un dominio propéptidico C-terminal (probacteriocina) el cual es liberado, tras el procesamiento de la preprobacteriocina en un punto característico de su extensión N-terminal (punto de procesamiento), y, concomitantemente, secretado al medio exocelular, con o sin modificaciones posttraduccionales, en forma de péptido activo o bacteriocina madura (Schnell *et al.*, 1988; Holo *et al.*, 1991; Freund y Jung, 1992; Van Belkum *et al.*, 1997). Las extensiones N-terminales

(secuencias líder del tipo doble glicina o péptidos señal) desempeñan un papel muy importante en el reconocimiento y procesamiento de las preprobacteriocinas y determinan el tipo de mecanismo implicado en el transporte de la probacteriocina correspondiente. Asimismo, las extensiones N-terminales mantienen inactivas biológicamente las bacteriocinas en el interior celular y, por lo tanto, protegen al microorganismo productor de sus efectos tóxicos (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). En lo que respecta a las modificaciones posttraduccionales de las probacteriocinas (establecimiento de anillos tioéter en los lantibióticos y de puentes disulfuro en las bacteriocinas del tipo pediocina, por ejemplo), se ha sugerido que posiblemente tengan lugar después de la translocación ya que la presencia de estas estructuras cíclicas o plegamientos dificultaría considerablemente la translocación de la bacteriocina a través de la membrana citoplasmática (Jack *et al.*, 1995).

En los últimos años se ha determinado la secuencia aminoacídica de un gran número de preprobacteriocinas comparando la secuencia aminoacídica obtenida por degradación de Edman de las bacteriocinas purificadas con la deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen estructural correspondiente. En la Tabla II.8 se muestra la secuencia aminoacídica de las preprobacteriocinas mejor caracterizadas hasta el momento; asimismo, se indica la secuencia correspondiente a sus extensiones N-terminales y a sus dominios propéptidicos C-terminales (probacteriocina) y el punto de procesamiento de estas preprobacteriocinas.

Diversos estudios realizados por Fremaux *et al.* (1993) y Havarstein *et al.* (1994) pusieron de manifiesto la homología existente entre la extensión N-terminal de la colicina V, producida por *E. coli*, y las extensiones N-terminales de la mayoría de las bacteriocinas no lantibióticos y de algunos lantibióticos. Así, pues, estos autores establecieron el siguiente patrón consenso: (i) dos residuos de glicina consecutivos (posiciones -1 y -2 respecto al punto de procesamiento); (ii) residuos hidrófobos en las posiciones -4, -7, -12 y -15; (iii) residuos polares con carga en las posiciones -8 (Havarstein *et al.*, 1994), -9 y -10 (Fremaux *et al.*, 1994) y (iv) un residuo de serina en la posición -11. El residuo de glicina en la posición -2 (G[-2]) está altamente conservado, mientras que la posición -1 (G[-1]) está sujeta a una mayor variabilidad, habiéndose descrito en algunos casos la presencia alanina y/o serina en esta posición (A/S[-1]). Por otra parte, Havarstein *et al.* (1995a) demostraron que el punto de procesamiento de estas preprobacteriocinas se sitúa inmediatamente después de los dos residuos de glicina en las posiciones -1 y -2, por lo que propusieron denominar a este tipo de extensión N-terminal como secuencia líder del tipo doble glicina.

Entre las bacteriocinas no lantibióticos con secuencia líder del tipo doble glicina se incluyen la mayoría de las descritas hasta el momento; entre otras, la pediocina AcH/PA-1 (Motlagh *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992), la leucocina A-UAL187 (Hasting y Stiles, 1991), la mesentericina Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), la sakacina A/curvacina A (Holck *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992), la sakacina P/674 (Tichaczek *et al.*, 1992; Holck *et al.*, 1994a; Tichaczek *et al.*, 1994), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1994), la enterocina A (Aymerich, 1996), la carnobacteriocina A/piscicolina 61 (Worobo *et al.*, 1994; Holck *et al.*, 1994b); las lactococcinas A, B (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1992a; 1992) y sistemas de dos péptidos, como la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991b; Fremaux *et al.*, 1993), las lactococcinas G y M

TABLA II.8. Secuencia aminoacídica de diversas preprobacteriocinas producidas por bacterias lácticas

| | Extensión N-terminal | | | | | Dominio C-terminal (probacteriocina) | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-----|-----|----|----|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|----|----|----|
| | -30 | -20 | -10 | -1 | +1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Clase I (lantibióticos) | | | | | | | | | | |
| Nisina A | | | | | | I | TSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK | | | |
| Nisina Z | | | | | | I | TSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNCISHVSK | | | |
| Salivaricina A | | | | | | K | RSGSWIATITDDCPNSVFVCC | | | |
| Lacticina 481 ^a | | | | | | K | GGSGVIHTISHECNMNSWQFVFTCCS | | | |
| Clase II | | | | | | | | | | |
| Pediocina PA-1 ^b | | | | | | K | YYNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC | | | |
| Leucocina A-UAL187 | | | | | | K | YYNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGNGFW | | | |
| Mesentericina Y105 | | | | | | K | YYNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHLANGNGFW | | | |
| Sakacina A ^c | | | | | | A | RSYNGVYCNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM | | | |
| Sakacina P ^d | | | | | | K | YYNGVHCGKHSCTVDWGTAGNIGNNAAANWATGGNAGWNK | | | |
| Acidocina A | | | | | | K | TYTGTVHCTKKSLLGWKVRKLVIPGTLCKQSLPIKQDLKILLGWATGAFGKTFH | | | |
| Carnobacteriocina BM1 | | | | | | A | ISYNGVYCNKEKCVNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH | | | |
| Carnobacteriocina B2 | | | | | | V | NYNGVSCSKTKCSVNWQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP | | | |
| Enterocina A | | | | | | T | THSGKYNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC | | | |
| Lactococcina Ga | | | | | | G | TWDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH | | | |
| Lactococcina Gb | | | | | | K | KWGLAWVDPAYEFIKFGKGAIKEGNKDKWKNI | | | |
| Lactococcina M | | | | | | I | RGTGKGLAAAMVSGAAMGAIGAAGGPGVGAIMGAWGGAVGGAMKYSI | | | |
| Lactococcina N | | | | | | G | SIWGAIAGGAVKGAIAASWTGNPVGIGMSALGGAVLGGVTYARPVH | | | |
| Lactococcina A | | | | | | K | LTFIQSTAAGDLYNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGWMGGAAGGFLHH | | | |
| Carnobacteriocina A ^c | | | | | | D | QMSDGVNYGKSSLSKGGAKCGLGIVGGIATIPSGPLGLAGAAGVINSCKM | | | |
| Lactococcina B | | | | | | S | LQYVMSAGPYTWKDTRTGKTICKQTIDTASYTFGVMAEGWGKTFH | | | |
| Bacteriocina 31 | | | | | | A | TYYGNGLYCNKQKCWVDWNKASREIGKIIVNGWVQHGPWAPR | | | |
| Divergicina A | | | | | | A | APKITQKQKNCVNGQLGGMLAGALGGPGGVVLGGIGGAIAGGCFN | | | |
| Acidocina B | | | | | | N | IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAVASGASLGTAFAAILGVTLPAWALAAAGALGATAA | | | |

La flecha vertical indica el punto de procesamiento de las preprobacteriocinas; Se ha subrayado la secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina; ^a secuencia idéntica a la lactococcina DR; ^b secuencia idéntica a la pediocina ACh; ^c secuencia idéntica a la curvacina A; ^d secuencia idéntica a la sakacina 674 y bavaricina A; ^e secuencia idéntica a la piscicolina 61. Las referencias de las bacteriocinas están indicadas en la sección II.4.1 y Tabla II.7. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

(Havarstein *et al.*, 1993; Van Belkum *et al.*, 1991a) y la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997). Recientemente, Cintas *et al.* (1998b) han demostrado, mediante experimentos de expresión de proteínas *in vivo* e *in vitro*, que las enterocinas L50A y L50B carecen de extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) y se sintetizan y secretan como péptidos activos.

Los lantibióticos con secuencia líder del tipo doble glicina incluyen la salivaricina A (Ross *et al.*, 1993), la estreptococcina A-FF22 (Hynes *et al.*, 1993), la lactocina S (Skaugen, 1994; Skaugen *et al.*, 1997) y la lacticina 481/lactococcina DR (Piard *et al.*, 1993; Rince *et al.*, 1994). En lo que respecta a las nisinas A y Z, estudios realizados por Van der Meer *et al.* (1993) han demostrado que su extensión N-terminal no está relacionada con la de la mayoría de las preprobacteriocinas descritas. Así, pues, sus preprolantibióticos correspondientes contienen una extensión N-terminal con una secuencia consenso en el punto de procesamiento caracterizada por la presencia de un aminoácido polar y con carga (arginina o glutamina) en la posición -1 y un residuo de prolina en la posición -2 (Jack *et al.*, 1995).

Hasta fechas muy recientes, todas las bacteriocinas no lantibióticas caracterizadas presentaban secuencias líder del tipo doble glicina. No obstante, en los últimos años se ha descrito que la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996), la acidocina B (Leer *et al.*, 1995) y la divergicina A (Worobo *et al.*, 1995) poseen una extensión N-terminal diferente que actúa de péptido señal (Tabla II.8). Von Heijne (1986) analizó los péptidos señal de numerosas proteínas de microorganismos eucariotas y procariotas y concluyó que todos poseen tres regiones o dominios característicos: (i) una región hidrofílica en el extremo N-terminal, denominada dominio N, con carga neta positiva y constituida por 1-5 aminoácidos; a continuación, (ii) una región de aproximadamente 7-15 aminoácidos que constituye el núcleo central hidrofóbico o dominio H y, finalmente, (iii) una región menos hidrofoba en el extremo C-terminal, denominada dominio C, con características muy peculiares y constituida por 5-6 residuos aminoacídicos. El punto de procesamiento de los prepropéptidos que contienen péptidos señal se sitúa inmediatamente después del dominio C de su extremo C-terminal, representando el primer aminoácido del péptido maduro la posición +1. Esta región cumple la denominada "regla del -3-1" (Von Heijne, 1984), que requiere la presencia de un residuo aminoacídico de pequeño tamaño molecular y neutro (alanina, serina, glicina, cisteína o treonina) o, excepcionalmente, glutamina en la posición -1 (respecto al punto de procesamiento), así como que el aminoácido de la posición -3 no sea ni aromático (triptófano, fenilalanina, tirosina o histidina), ni cargado (ácido aspártico, ácido glutámico, lisina o arginina), ni grande polar (asparragina o glutamina). Por otra parte, el residuo que ocupa la posición -2 suele ser un aminoácido aromático, con carga o grande polar; la glicina suele ocupar las posiciones -4 y -1 y la prolina nunca está presente en las posiciones -3, -2, -1 ó +1 pero, por el contrario, se encuentra frecuentemente en la posición -5 (Perlman y Halvorson, 1983; Von Heijne, 1984).

II.4.7. Procesamiento y transporte de las bacteriocinas

Desde hace tiempo se conoce que los péptidos que se sintetizan como prepropéptidos con una extensión N-terminal del tipo péptido señal son secretados a través de la Ruta General de Secreción de Proteínas (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*) o sistema *sec*-dependiente, en el que intervienen los productos de los genes *sec* y las peptidasas de señal (Pugsley, 1993;

Schatz y Beckwith, 1990). En los últimos años este sistema de transporte ha sido ampliamente revisado por diversos autores (Pugsley, 1993; Gierasch, 1989; Wandersman, 1992). Hasta la fecha, las únicas bacteriocinas descritas que se procesan y secretan a través del GSP son la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996), la acidocina B (Leer *et al.*, 1995) y la divergicina A (Worobo *et al.*, 1995).

Otros mecanismos de transporte de proteínas y péptidos son los sistemas de secreción independientes de un péptido señal o sistemas *sec*-independientes, caracterizados principalmente en las bacterias Gram-negativas, y que incluyen, entre otros: (i) la familia de los transportadores ABC (del inglés *ATP-Binding-Cassette*) y (ii) la familia de los transportadores de las sustancias tipo pululanasa (Fath y Kolter, 1993; Higgins, 1992; Salmond y Reeves, 1993). Mediante transportadores ABC los microorganismos secretan al medio exocelular diversas sustancias como, entre otras, antibióticos, compuestos no proteicos (ej. drogas lipófilas y polisacáridos), péptidos que se sintetizan como prepéptidos con una extensión N-terminal (ej. el factor de competencia de *S. pneumoniae*, la colicina V de *E. coli* y la mayoría de las bacteriocinas) y péptidos que carecen de extensión N-terminal (ej. la α -hemolisina de *E. coli* y las metaloproteasas B y C de *Serratia marcescens*) (Wagner *et al.*, 1983; Gilson *et al.*, 1990; Higgins, 1992; Fath y Kolter, 1993; Hui *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). Los transportadores ABC contienen generalmente: (i) un dominio C-terminal ATPásico de aproximadamente 200 aa localizado en la cara interna de la membrana citoplasmática y con dos secuencias conservadas que constituyen el lugar de fijación de una molécula de ATP y (ii) un dominio N-terminal hidrófobo integrado en la membrana que contiene generalmente seis segmentos transmembrana y que es responsable del reconocimiento y translocación de los sustratos a través de la membrana citoplasmática (Higgins, 1992; Havarstein *et al.*, 1995a). Ambos dominios se pueden expresar como dos polipéptidos independientes o como una única cadena polipeptídica, como sucede en la mayoría de los transportadores ABC bacterianos (Hyde *et al.*, 1990). Los transportadores ABC activos son homodímeros que requieren la hidrólisis de ATP para obtener la energía necesaria para la translocación del sustrato (Mimmack *et al.*, 1989).

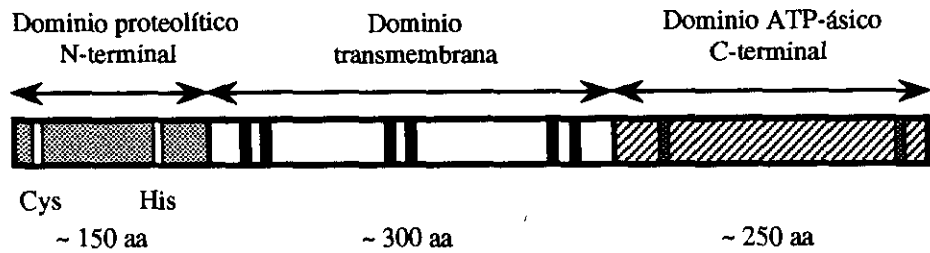
Las bacteriocinas con secuencia líder del tipo doble glicina, son procesadas y transportadas, mediante un sistema integrado, al menos, por: (i) una proteína transmembrana específica perteneciente a la familia de los transportadores ABC y responsable del procesamiento y translocación de los sustratos a través de la membrana interna (Gilson *et al.*, 1987; 1990; Marugg *et al.*, 1992; Stoddard *et al.*, 1992; Havarstein *et al.*, 1995a) y (ii) una proteína de función desconocida, denominada proteína accesoria, necesaria para la liberación de la bacteriocina al exterior (Stoddard *et al.*, 1992; Franke *et al.*, 1996; Van Belkum *et al.*, 1997).

La comparación de las secuencias aminoacídicas de transportadores ABC de diferentes sustratos, entre los que se incluyeron los transportadores de las lactococcinas A, B y M (LcnC) (Stoddard *et al.*, 1992) y de la pediocina PA-1 (PedD) (Marugg *et al.*, 1992), los hipotéticos transportadores ABC de la lactococcina G (LagD) (Havarstein *et al.*, 1995a) y de la lactococcina DR (LcnDR3) (Rince *et al.*, 1994), así como el del factor de competencia de *S. pneumoniae* (ComA) (Havarstein *et al.*, 1995b), el de la colicina V de *E. coli* (CvaB) (Fath y Kolter, 1993) y el de la α -hemolisina de *E. coli* (HlyB), reveló una significativa homología entre ellos (Havarstein *et al.*, 1995a). Así, pues, se observó que todos presentan, además de los dos

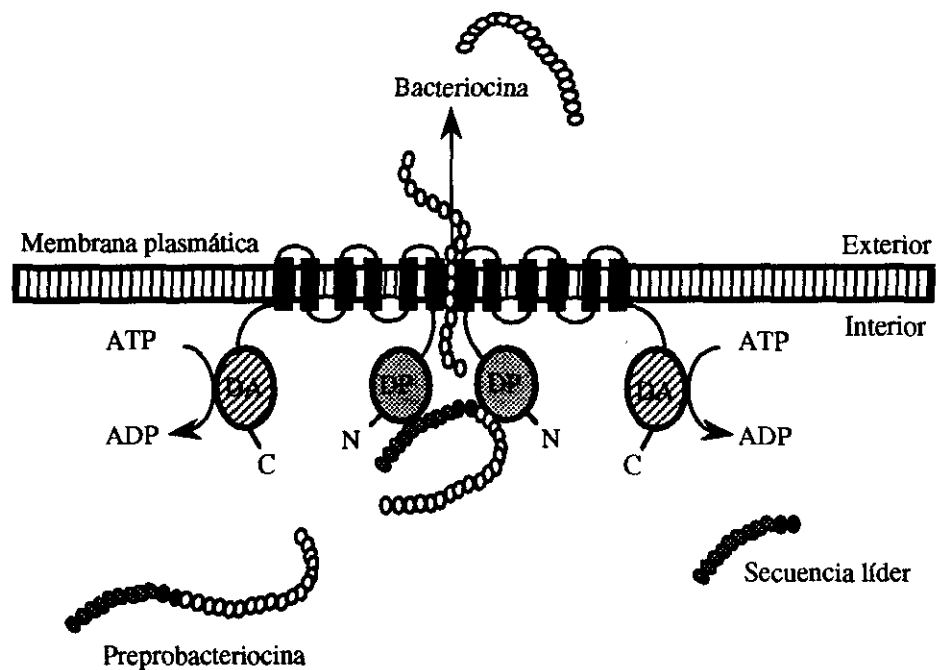
dominios descritos anteriormente, un tercer dominio constituido por los 150 aa del extremo N-terminal y localizado en la cara interna de la membrana plasmática (Figura 2.2A). Los transportadores de los sustratos con secuencias líder del tipo doble glicina se distinguen porque este dominio presenta dos secuencias altamente conservadas: $QX_4D/ECX_2AX_3MX_4Y/FGX_4IL$ y $HY/FY/VVX_{10}I/LXDP$ (donde, Q, glutamina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; C, cisteína; A, alanina; M, metionina; Y, tirosina; F, fenilalanina; G, glicina; I, isoleucina; L, leucina; H, histidina; V, valina; P, prolina; X_n , número de residuos no conservados) (Havarstein *et al.*, 1995a). Las proteínas transportadoras ABC de las bacteriocinas con secuencias líder del tipo doble glicina están constituidas por 700 aminoácidos, aproximadamente, mientras que la del antibiótico nisina, contiene 100-200 aminoácidos menos, ya que carece de este tercer dominio N-terminal (Havarstein *et al.*, 1994; Nes *et al.*, 1996). Con objeto de estudiar el papel biológico del tercer dominio N-terminal de estas proteínas transportadoras, Havarstein *et al.* (1995a) clonaron y expresaron los 150 aa del extremo N-terminal de la proteína ABC transportadora de la lactococcina G (LagD) (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Havarstein *et al.*, 1993) en un vector de clonación y, tras su purificación, demostraron *in vitro* que el dominio purificado actuaba sobre la preprolactococcina G en el punto de procesamiento consenso, es decir, en el extremo C-terminal de la secuencia líder, inmediatamente después de los dos residuos de glicina (G [-2] y G [-1]) produciendo la liberación de su extensión N-terminal y, concomitantemente, de la lactococcina G biológicamente activa. Estos resultados demuestran que el dominio N-terminal característico de este grupo de transportadores ABC posee capacidad proteolítica, por lo que se denomina dominio N-terminal proteolítico (Havarstein *et al.*, 1995a); asimismo, estos autores observaron que los residuos de cisteína e histidina presentes en la primera y en la segunda secuencia conservada del dominio N-terminal proteolítico (secuencias cisteína e histidina, respectivamente) son esenciales para que tenga lugar el procesamiento de las prebacteriocinas. Venema *et al.* (1995) obtuvieron resultados similares realizando un estudio *in vivo* con el transportador ABC de la pediocina PA-1 (PedD) (González y Kunka, 1987; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992). Estos autores clonaron en *E. coli* el gen estructural de la prepediocina PA-1 (*pedA*) junto con el dominio N-terminal de PedD, observando la presencia intracelular de bacteriocina activa, lo que demuestra que el dominio N-terminal es responsable de la liberación de la secuencia líder (procesamiento) y que este proceso no está acoplado al transporte de la bacteriocina activa al exterior. Basándose en sus resultados, Havarstein *et al.* (1995a) propusieron el siguiente modelo para el procesamiento y transporte de las bacteriocinas con secuencia líder del tipo doble glicina: (i) el transportador ABC homodimérico se localiza en la membrana citoplasmática de forma que los doce segmentos hidrófobos transmembrana quedan integrados en ella y los dominios C y N-terminal se localizan en el citoplasma (Figura 2.2B), (ii) cada dominio proteolítico del extremo N-terminal fija una molécula de prebacteriocina, (iii) paralelamente, cada dominio C-terminal fija una molécula de ATP, cuya hidrólisis suministra la energía necesaria para que se produzca un cambio conformacional en la estructura del transportador, que se traduce concomitantemente en el procesamiento y translocación o transporte al exterior de las dos bacteriocinas simultáneamente.

Stoddard *et al.* (1992) identificaron en el sistema de la lactococcina A un segundo gen, *lcnD*, contiguo al gen de la proteína ABC transportadora de 716 aa (LcnC), que codifica una proteína

A



B



| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Cys = Secuencia conservada cistefna | DP = Dominio proteolítico N-terminal |
| His = Secuencia conservada histidina | DA = Dominio ATP-ásico C-terminal |
| ■ = Segmento (hélice) transmembrana | ● = Punto de procesamiento (Gly-Gly) |
| ■ = Puntos de fijación de ATP | N, C = Extremos N- y C-terminal |

Figura 2.2. Representación esquemática del modelo propuesto para los transportadores ABC de las bacteriocinas con secuencias líder del tipo doble glicina. Organización de los dominios peptídicos del transportador (A) y localización en la membrana plasmática (B).

Fuente: Havarstein *et al.* (1995) y Nes *et al.* (1996).

de 474 aa (LcnD) que presenta una gran homología con un grupo de proteínas asociadas a los procesos de translocación de sustratos a través de transportadores ABC, entre las que se encuentran las proteínas ComB del factor de competencia de *St. pneumoniae* (Havarstein *et al.* 1995b; Hui *et al.*, 1995) y HlyD de la α -hemolisina de *E. coli* (Wagner *et al.*, 1983). El papel de estas proteínas, denominadas proteínas accesorias, se desconoce pero se sabe que son esenciales para que tenga lugar la liberación de los sustratos al exterior (Nes *et al.*, 1996). En este contexto, Venema *et al.* (1995), clonaron el gen estructural de la prepediocina PA-1 (*pedA*) y el de la proteína ABC transportadora de 724 aa (*pedD*) en una cepa de *E. coli* y detectaron únicamente prepediocina y pediocina madura intracelulares; sin embargo, cuando clonaron además el gen *pedC*, que codifica una proteína de 174 aa (PedC) similar a la proteína accesoria LcnD, observaron la presencia extracelular de bacteriocina activa, concluyendo que ambas proteínas, la ABC transportadora (PedD) y la accesoria (PedC), son necesarias para su transporte al medio extracelular.

En los últimos años se ha descrito la presencia de proteínas ABC específicas y proteínas accesorias involucradas en los sistemas de transporte de numerosas bacteriocinas de la clase II, entre las que se encuentran, además de las anteriores, la pediocina AcH (Bukhtiyarova *et al.*, 1994), la leucocina A-UAL187 (Van Belkum y Stiles, 1995), la mesentericina Y105 (Fremaux *et al.*, 1995), la sakacina A (Axelsson y Holck, 1995), la sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1994; Huhne *et al.*, 1996), carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1995b; 1997b) y las plantaricinas EF, JK y N (Diep *et al.*, 1996).

II.4.8. Regulación de la producción de bacteriocinas

La mayor parte de la investigación sobre la regulación de la producción de bacteriocinas se ha realizado con las colicinas de *E. coli*, las cuales, salvo algunas excepciones (ej. colicina V), son inducidas por el sistema SOS, cuya respuesta es desencadenada por una acumulación de daños en el ADN debidos a agentes como la luz ultravioleta y la mitomicina C (Lazdunski *et al.*, 1988; Pugsley, 1984a). La regulación de la producción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas aún no se ha evaluado adecuadamente; no obstante, se ha descrito que la producción de fermenticina por *Lb. fermenti* 466 (De Klerk y Smit, 1967) y de lactocina 27 por *Lb. helveticus* SB22 (Upreti y Hinsdill, 1973) no resulta inducida por el tratamiento de los cultivos con luz ultravioleta o con mitomicina C. Por el contrario, Rammelsberg *et al.* (1990) observaron que el tratamiento de los cultivos de *Lb. casei* B80 con mitomicina C permitía aumentar entre 5 y 7 veces la producción de caseicina 80. Por otra parte, Hughes y Barefoot (1990) describieron que la inducción, o al menos la estimulación, de la producción de lactacina B por *Lb. acidophilus* N2 es debida a la presencia en el medio de cultivo de, al menos, 10^6 ufc de *Lb. lactis* ATCC4797 - un microorganismo sensible a la bacteriocina. Recientemente, estos autores purificaron y secuenciaron parcialmente una proteína de 58 KDa, denominada "factor de inducción" (FI), producida por *Lb. lactis* ATCC4797 y responsable de la inducción de la síntesis de lactacina B (Barefoot *et al.*, 1994). Asimismo, se han identificado los mecanismos de la inducción de la producción de lantibióticos (Clase I) como la nisina (Kuipers *et al.*, 1995) y de bacteriocinas no lantibióticos de pequeño tamaño molecular y termoestables (Clase II) como la sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995), la sakacina P de *Lb. sake* LTH673 (Eijsink *et al.*, 1996;

Brurberg *et al.*, 1997), las carnobacteriocinas A, B2 y BM1 de *Cb. piscicola* LV17 y LV17B (Saucier *et al.*, 1995; Quadri *et al.*, 1997a; 1997b; Saucier *et al.*, 1997) y las plantaricinas EF, JK y N de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998). En este contexto, Kuipers *et al.* (1995), Ra *et al.*, (1996) y De Ruyter *et al.* (1996) demostraron que la nisina, además de ejercer actividad antimicrobiana, actúa como factor de inducción de la transcripción de los genes asociados a su síntesis. Por otra parte, la producción de las bacteriocinas de la clase II mencionadas anteriormente desaparecía cuando la cepa productora (de fenotipo Bac⁺) se inoculaba en el medio de cultivo a niveles iguales o inferiores a 10⁴ ufc/ml. El nuevo fenotipo de los cultivos (Bac⁻) se mantenía durante las sucesivas transferencias de los cultivos, independientemente del tamaño de los inóculos, pero podía revertirse a Bac⁺ si se adicionaba a los cultivos un pequeño volumen (0,01-1% [v/v]) de un sobrenadante libre de células del correspondiente cultivo Bac⁺, lo que indicaba que éste contenía el factor de inducción de la producción de estas bacteriocinas. Recientemente, se han purificado a homogeneidad el factor de inducción del fenotipo Bac⁺ de *Lb. plantarum* C11 (productor de las plantaricinas EF, JK y N) (Diep *et al.*, 1995 y Anderssen *et al.*, 1998) y de *Lb. sake* LTH673 (productor de sakacina P) (Eijsink *et al.*, 1996), denominados, respectivamente, plantaricina A y Orf1. La plantaricina A y el Orf1 son péptidos similares a las bacteriocinas, ya que son catiónicos, de pequeño tamaño molecular (26 y 19 aminoácidos, respectivamente) y adoptan, posiblemente, una estructura de α -hélice anfifílica. Recientemente, Anderssen *et al.* (1998) han realizado diversos ensayos en los que se pone de manifiesto que el factor de inducción PlnA ejerce actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias lácticas. Esta misma dualidad en la función biológica se ha descrito también para algunas bacteriocinas de la clase II como las carnobacteriocinas de *Cb. piscicola* LV17 (Saucier *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1997) y la carnobacteriocina B2 de *Cb. piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1997a). No obstante, Quadri *et al.* (1997b) obtuvieron posteriormente la secuencia genética de una proteína que actúa como factor de inducción de la transcripción de los genes asociados a la producción de la carnobacteriocina B2. El análisis genético de la plantaricina A, de Orf1 y de otros posibles factores de inducción ha puesto de manifiesto que se sintetizan -al igual que las bacteriocinas cuya síntesis inducen- en forma de prepéptido que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina, lo que sugiere que probablemente se secretan por el mismo mecanismo (sección II.4.7) (Diep *et al.*, 1996; Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Kleerebezem *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1997b).

La regulación de la producción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas y de otras bacterias Gram-positivas parece atender a un esquema común en el cual la molécula señal o feromona -el factor de inducción- es un péptido que se procesa, y a veces modifica, post-traduccionalmente y que se secreta por un transportador ABC específico. Este péptido secretado actúa como señal de entrada (*input signal*) de un sistema de transducción de señal (*signal-transduction system*). Este sistema de regulación se emplea generalmente en la respuesta bacteriana a los cambios medioambientales (Bourret *et al.*, 1991; Hoch y Silhavy, 1995) y consta, generalmente, de dos componentes: (i) una proteína histidín-quinasa (PHQ) que actúa como un sensor ambiental que registra señal(es) específica(s) y (ii) una proteína que actúa como regulador de la respuesta (RR) (*output signal*), la cual está a su vez modulada por la PHQ (Diep, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997). La comunicación entre la PHQ y el RR implica reacciones

acopladas de fosforilación y defosforilación. Entre los sistemas de regulación de dos componentes mejor estudiados se encuentran el sistema *agr* de *St. aureus* (Balaban y Novick, 1995) y el sistema *com* de *S. pneumoniae* (Havarstein *et al.*, 1995b; Pestova *et al.*, 1996). En la Figura 2.3 se ilustra el modelo propuesto para el sistema de transducción de señal de dos componentes responsable de la regulación de la producción de las bacteriocinas de la clase II (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997). El extremo N-terminal de la PHQ incluye un dominio de entrada que funciona como un sensor y que se localiza en el lado periplásmico de la membrana citoplasmática; por el contrario, el extremo C-terminal, que actúa de transmisor, se encuentra en el lado citoplasmático y posee actividad autoquinásica y un residuo conservado de histidina como sitio de fosforilación. El dominio de entrada y el transmisor están conectados por un dominio de membrana constituido por 6 hélices transmembrana (PTH). Por otra parte, el regulador de respuesta (RR) está integrado por un dominio N-terminal que actúa de receptor, y que contiene un residuo conservado de ácido aspártico como sitio de fosforilación, y por un dominio C-terminal responsable directamente de la respuesta adaptativa. La fosforilación del dominio receptor del RR provoca cambios intramoleculares en el dominio de salida, el cual se activa y regula la transcripción de los genes diana. Esta regulación tiene lugar, probablemente, por la unión del RR activado a lugares específicos del ADN en la región del promotor o en sus proximidades, lo que provoca la estimulación o la inhibición de la unión de la ARN polimerasa al promotor y, por tanto, de la síntesis de bacteriocina. Aunque aún se desconoce como se activa el sistema de autoinducción que induce la producción de bacteriocinas, se han propuesto dos modelos: a) el factor de inducción (FI) se produce constitutivamente en cantidades muy pequeñas y se acumula gradualmente durante el crecimiento bacteriano; cuando la concentración del FI supera el umbral requerido para su autoinducción se inicia la síntesis de bacteriocina. Este modelo se basa, por tanto, en un mecanismo de control dependiente de la densidad celular de los cultivos. Por el contrario, el modelo alternativo b) propone que el FI se produce constitutivamente a una concentración ligeramente inferior al umbral de activación. Debido a modificaciones en las condiciones ambientales (ej. variaciones de los nutrientes o de las condiciones físico-químicas de crecimiento) se produce un aumento transitorio de la síntesis del FI, lo que provoca la autoinducción de su producción y, consiguientemente, la síntesis de bacteriocina (Nes *et al.*, 1996).

II.4.9. Caracterización genética de las bacteriocinas

Los determinantes genéticos asociados a la producción de bacteriocinas activas biológicamente son (i) el gen que codifica la preprobacteriocina correspondiente, denominado gen estructural, (ii) el gen que codifica la proteína que confiere inmunidad al microorganismo productor frente a su propia bacteriocina, (iii) los genes responsables del procesamiento y transporte al medio exocelular de las bacteriocinas y, en algunos casos, (iv) los genes que codifican los enzimas implicados en las modificaciones posttraduccionales. La producción de algunas bacteriocinas de la clase II está regulada a través de un sistema de transducción de señal de dos componentes, por lo que las bacterias lácticas productoras poseen, además de los genes mencionados anteriormente, otros determinantes genéticos asociados a dicha regulación: (i) el gen que codifica el factor de inducción o molécula señal (FI), (ii) el gen que codifica la molécula

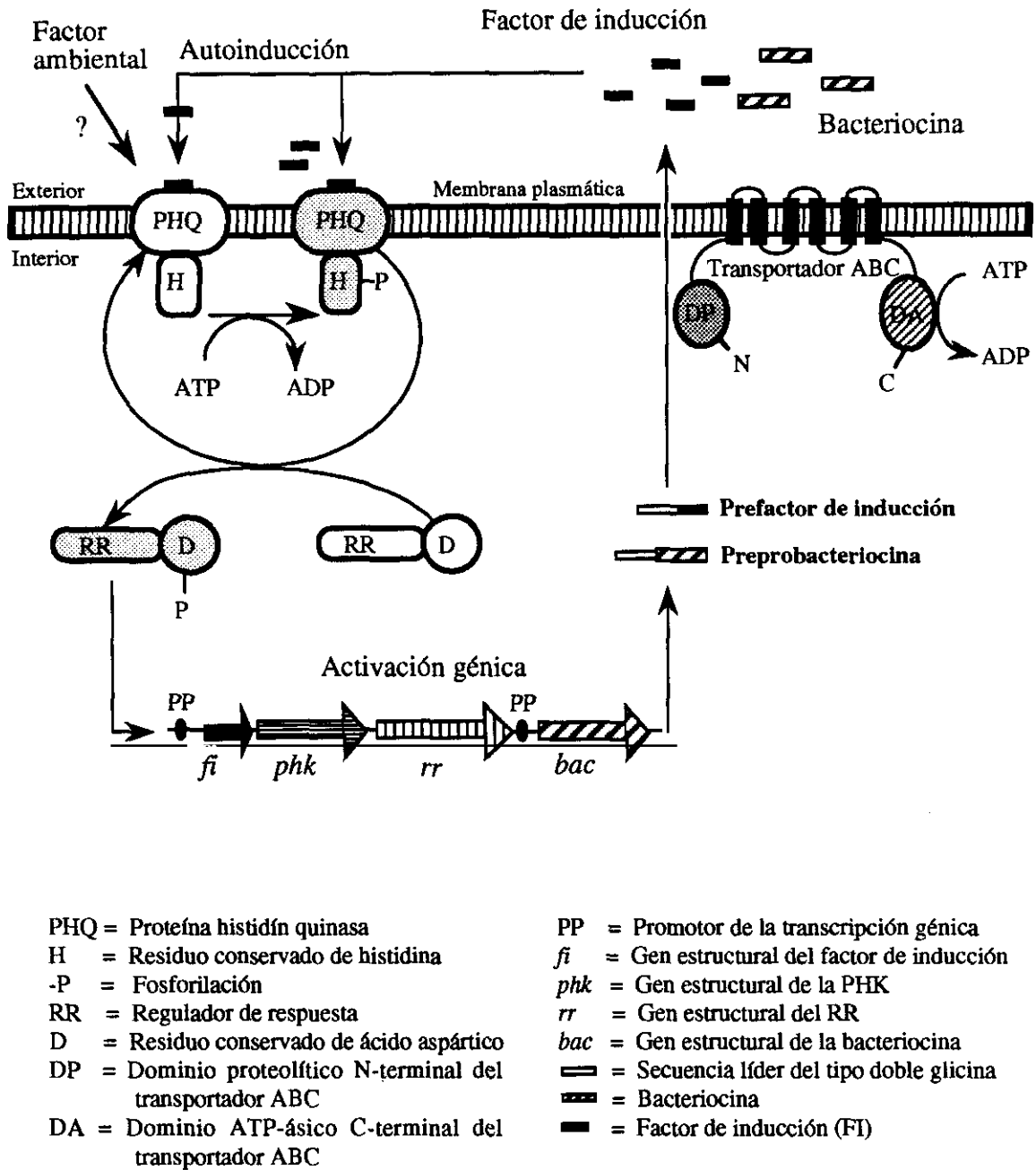


Figura 2.3. Representación esquemática del mecanismo de regulación de la producción de las bacteriocinas de la clase II en el que intervienen el factor de inducción y el sistema de transducción de señal de dos componentes.

En la parte superior derecha se muestra un monómero del transportador ABC de las bacteriocinas y factores de inducción con secuencias líder del tipo doble glicina. Fuente: Nes *et al.* (1996) y Kleerebezem *et al.* (1997).

que actúa como sensor ambiental (PHQ) y, (iii) uno o dos genes que codifican proteínas que actúan como reguladores a nivel transcripcional (RR) (Nes *et al.*, 1996).

Los determinantes genéticos asociados a la producción de bacteriocinas se encuentran localizados en plásmidos (que pueden ser o no conjugativos) o en el cromosoma (a veces formando parte de un transposón compuesto) (Jack *et al.*, 1995). No obstante, en el caso de la carnobacteriocina BM1, producida por *C. piscicola* LV17B, se ha comprobado que aunque el gen estructural de la bacteriocina y el de su hipotética proteína de inmunidad se localizan en el cromosoma, la aparición de los fenotipos Bac+ Inm+ requiere la presencia de un plásmido de 61 Kb (pCP40) (Quadri *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995a; Quadri *et al.*, 1997b; Saucier *et al.*, 1997). En lo que respecta a los antibióticos, las nisinas A y Z (Horn *et al.*, 1991; De Vos *et al.*, 1993), la salivaricina A, la estreptococcina A-FF22 (Simpson y Tagg, 1986) y la carnocina UI49 (Nes y Tagg, 1996) presentan los determinantes genéticos asociados a su producción en el cromosoma, mientras que los de la lacticina 481/lactococcina DR (Piard *et al.*, 1993; Rince *et al.*, 1994) y la lactocina S (Skaugen, 1994; Skaugen *et al.*, 1997) se localizan en plásmidos de 70 y 50 Kb, respectivamente. Por otra parte, dentro de las bacteriocinas no antibióticas de pequeño tamaño molecular y termoestables, la sakacina P/674 (Huhne *et al.*, 1996; Holck *et al.*, 1994a), la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996), las bacteriocinas de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996; Anderssen *et al.*, 1998), la lactococcina G (Havarstein *et al.*, 1993; Nes *et al.*, 1995) y la lactacina F (Fremaux *et al.*, 1993; Allison y Klaenhammer, 1996) poseen los determinantes genéticos asociados a su producción en el cromosoma, mientras que en el caso de la pediocina PA-1/AcH (Venema *et al.*, 1995; Bukhtiyarova *et al.*, 1994), la leucocina A-UAL-187 (Van Belkum y Stiles, 1995), la mesentericina Y105 (Fremaux *et al.*, 1995), las lactococcinas A, B y M (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991a; 1992; Stoddard *et al.*, 1992), la sakacina A/curvacina A (Axelsson y Holck, 1995), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), las carnobacteriocinas A y B2 (Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1994), la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A (Worobo *et al.*, 1995), las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998b) y la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) se localizan en plásmidos cuyo tamaño oscila entre 3,4 Kb, en el caso de la divergicina A producida por *C. divergens* LV13 (Worobo *et al.*, 1995) y 131 Kb, en el caso de la lactococcina A producida por *L. lactis* WM4 (Stoddard *et al.*, 1992). Los determinantes genéticos de las bacteriocinas de cepas multiproductoras pueden localizarse en el mismo plásmido, como sucede con las lactococcinas A, B y M, codificadas en un único plásmido de 60 Kb (p9B4-6) de *L. lactis* 9B4 (Van Belkum *et al.*, 1991a; 1992) o de 72 Kb (pSM72) de *L. lactis* DPC938 (Morgan *et al.*, 1995); en diferentes plásmidos, como sucede con las carnobacteriocinas A y B2 producidas por *C. piscicola* LV17 cuyos determinantes genéticos se localizan en los plásmidos pCP49 (74 Kb) y pCP40 (61 Kb), respectivamente; o bien, en el cromosoma y en plásmidos, como es el caso de las carnobacteriocinas BM1, codificada en el cromosoma, y las carnobacteriocinas A y B2 (Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1994; 1995b; 1997b). Por otra parte, Venema *et al.* (1996b) han descrito que los genes responsables del procesamiento y transporte de la lactococcina A (genes homólogos a *lcnC* y *lcnD* del plásmido p9B4-6 de *L. lactis* 9B4) se localizan en el cromosoma de *L. lactis* IL1403, microorganismo no productor de lactococcina A.

En los operones de las bacteriocinas caracterizados hasta el momento como, entre otros, el

de la pediocina PA-1/AcH (Marugg *et al.*, 1992; Venema *et al.*, 1995; Motlagh *et al.*, 1994; Bukhtiyarova *et al.*, 1994), la nisina A (Siegers *et al.*, 1995; Ra *et al.*, 1996), las lactococcinas A, B y M (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991a; 1992; Stoddard *et al.*, 1992), la lactococcina G (Havarstein *et al.*, 1993), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), la leucocina A-UAL-187 (Van Belkum y Stiles, 1995), la mesentericina Y105 (Fremaux *et al.*, 1995), la lactacina F (Fremaux *et al.*, 1993; Allison y Klaenhammer, 1996), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), la sakacina A/curvacina A (Axelsson y Holck, 1995), la sakacina P (Huhne *et al.*, 1996), la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996), la divergicina A (Worobo *et al.*, 1995), la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) y las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1997b) los genes que codifican la hipotética proteína de inmunidad se localizan detrás de (*downstream*) y con la misma polaridad que los genes estructurales de la bacteriocina. Las únicas excepciones descritas hasta el momento son la carnobacteriocina A y la acidocina B, ya que inmediatamente detrás de sus genes estructurales se ha identificado un terminador *rho*-independiente de la transcripción (Worobo *et al.*, 1994; Leer *et al.*, 1995).

Los determinantes genéticos básicos asociados a la producción de las bacteriocinas de la clase II, esto es, el gen estructural de la preprobacteriocina, el gen de la inmunidad, el gen que codifica la proteína ABC transportadora y el gen que codifica la proteína accesoria se pueden organizar en un operón, como sucede en la pediocina PA-1 (Venema *et al.*, 1995), o en dos, como es el caso de la lactococcina A (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991a; Stoddard *et al.*, 1992; Nes *et al.*, 1995); no obstante, en todos los casos, el determinante genético de la inmunidad forma parte del mismo operón que el gen estructural de la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996). Sin embargo, Cintas *et al.* (1998b) han secuenciado un fragmento de 3,5 Kb del plásmido pCIZ1 (50 Kb) de *E. faecium* L50 que contiene los genes estructurales de las enterocinas L50A y L50B (*entL50A* y *entL50B*) y han puesto de manifiesto la ausencia de un gen de inmunidad o de cualquier otro relacionado con la producción de estas sustancias; asimismo, los análisis de transcripción efectuados demostraron que *entL50A* y *entL50B* constituyen por sí solos un operón y se transcriben en una unidad de transcripción pequeña, de aproximadamente 0,4 Kb (Cintas *et al.*, resultados no publicados).

Con respecto a la localización de los genes reguladores, en primer lugar se sitúa el gen que codifica el factor de inducción, seguidamente, el gen que codifica la proteína histidina-quinasa y, por último, el(los) gen(es) que codifica(n) la proteína reguladora. Estos determinantes genéticos se organizan tanto en un operón independiente, como en el caso de las plantaricinas EF y JK (Diep *et al.*, 1996), como formando parte de otro operón junto a los determinantes genéticos asociados al transporte, como en la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1995b; Quadri *et al.*, 1997b) (Figura 2.4E y 2.4D). Recientemente, Diep *et al.* (1996) han descrito la presencia de secuencias repetidas directas en zonas del ADN situadas en las regiones de los promotores o en sus proximidades y que posiblemente sean los lugares de unión de las proteínas reguladoras. Estas secuencias, denominadas cajas reguladoras, están altamente conservadas en cada microorganismo, lo que sugiere que los promotores correspondientes están bajo el control del mismo mecanismo de regulación (Nes *et al.*, 1996).

A continuación se describe la organización molecular de *clusters* génicos asociados a la producción de los lantibióticos (clase I) nisina A y Z y de diversas bacteriocinas de la clase II, así

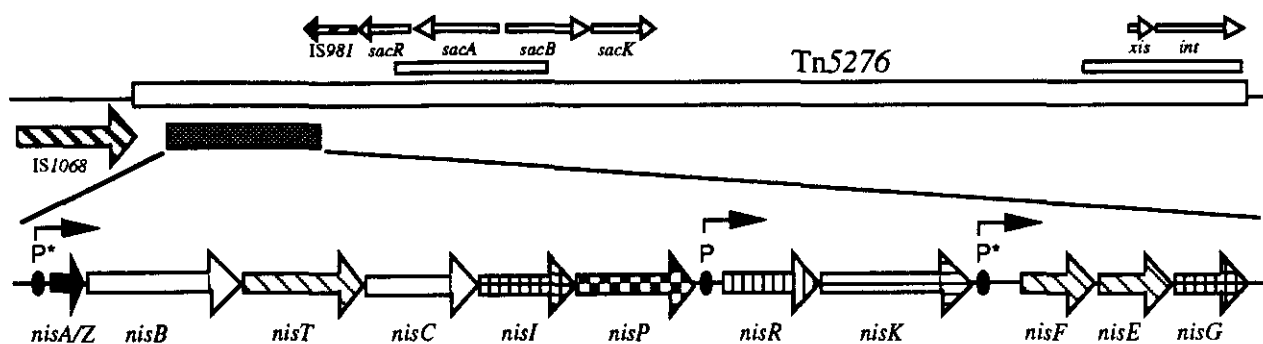
como los productos codificados por dichos genes y su función biológica.

II.4.9.1. Localización y organización molecular de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la nisina

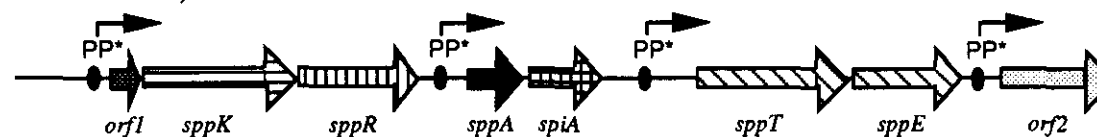
Desde hace tiempo se conoce que las bacterias lácticas productoras de nisina A/Z (fenotipo Nis⁺) poseen otros dos fenotipos genéticamente ligados: la inmunidad a la nisina (Inm⁺) y la capacidad de fermentar la sacarosa (Sac⁺) (Hirsch y Grinstead, 1951). En un principio se consideró que los determinantes genéticos correspondientes se localizaban en un plásmido de 45 Kb (Hirsch y Grinstead, 1951; Le Blanck *et al.*, 1980); sin embargo, posteriormente se ha demostrado que dichos genes forman parte, junto a otros asociados a la producción de nisina, de un transposón o elemento genético transponible de 70 Kb localizado en el cromosoma (Figura 2.4A) (Dodd *et al.*, 1990; Horn *et al.*, 19991; Rauch *et al.*, 1994). Rauch y de Vos (1992) analizaron la estructura del transposón conjugativo Tn5276 de *L. lactis* NIZOR5 productor de nisina A. A diferencia de otros transposones conjugativos, como el Tn1545 y el Tn916, que muestran en sus extremos secuencias repetidas inversas, Tn5276 posee secuencias asimétricas y sin homología. En su extremo 5', a unos 250 pb en dirección 3', se encuentra un elemento de inserción, IS1068, similar al IS904 del transposón conjugativo Tn5301 de *L. lactis* NCFB894 (Horn *et al.*, 1991; Rauch *et al.*, 1990) que muestra una organización genética idéntica a la de Tn5276 (Rauch y de Vos, 1992). Diversos estudios realizados por Rauch *et al.* (1994) indican que estos elementos de inserción no están implicados en la transposición conjugativa de Tn5276 y Tn5301. Recientemente, Rauch y de Vos (1994) han identificado los genes de transposición *xis* e *int* en el extremo 3' de Tn5276. El gen *int* codifica una proteína de 379 aa que presenta una gran homología con varias integrasas descritas y que parece ser esencial en el proceso de escisión de los extremos de Tn5276. Asimismo, el gen *xis* codifica una proteína catiónica de pequeño tamaño y función desconocida, pero cuya expresión incrementa la eficacia del proceso de transposición. Mediante sondas de ADN, obtenidas a partir de la secuencia aminoacídica de la nisina A, se han localizado los determinantes genéticos de esta bacteriocina en diversas cepas de *L. lactis* y, posteriormente, se han clonado en *E. coli* y secuenciado (Dodd *et al.*, 1990; Steen *et al.*, 1991; Rauch y de Vos, 1992; Engelke *et al.*, 1994; Immonen *et al.*, 1995; Siegers y Entian, 1995; Ra *et al.*, 1996). La organización molecular del *cluster* transmisible de la nisina A se esquematiza en la Figura 2.4A. Tras la secuencia de inserción IS1068 y en dirección 3', se localizan los 11 determinantes genéticos asociados a la producción de nisina (*nis* (A/Z)BTCIPRKFEF) en una región de 15 Kb y, a continuación y con polaridad opuesta, se sitúan los genes *sac* responsables de la fermentación de la sacarosa (Siegers y Entian, 1995). Recientemente, Ra *et al.* (1996) han demostrado, mediante análisis de transcripción (*Northern Blot*) y la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) empleando la transcriptasa inversa (RT/PCR), que los genes *nis* de *L. lactis* N8 constituyen, al menos, dos unidades de transcripción independientes, el operón *nis*(A/Z)BTCIPRK y el operón *nis*FEF, transcritas a partir de los promotores regulados de *nisA* y *nisF*, los cuales muestran una homología del 80%. El gen *nisB* y los 6 genes situados *downstream* se expresan aproximadamente en la misma proporción que el gen estructural *nisA/Z*. Esta observación, unida

Nisina, *Lactococcus lactis*

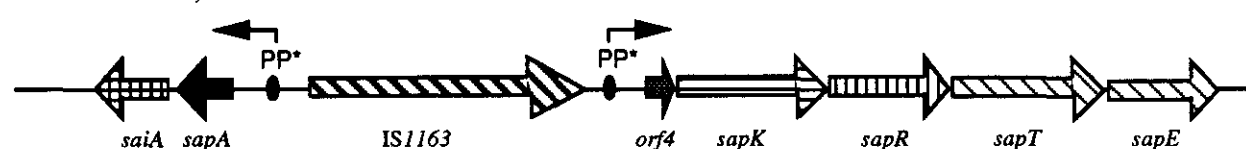
A

Sakacina P, *Lactobacillus sake* Lb674

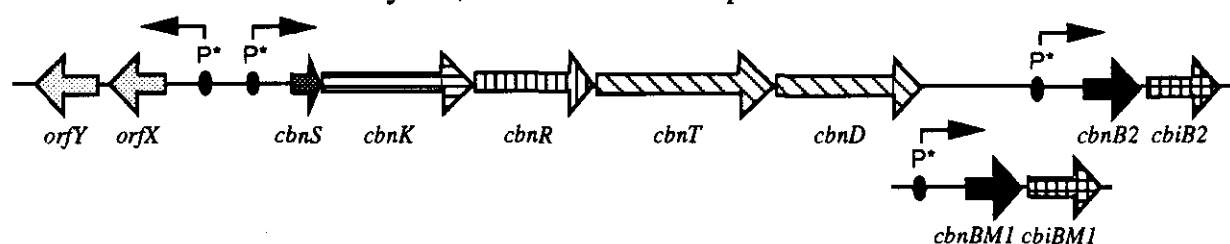
B

Sakacina A, *Lactobacillus sake* Lb706

C

Carnobacteriocinas BM1 y B2, *Carnobacterium piscicola* LV17B

D

Plantaricinas EF, JK y N, *Lactobacillus plantarum* C11

E

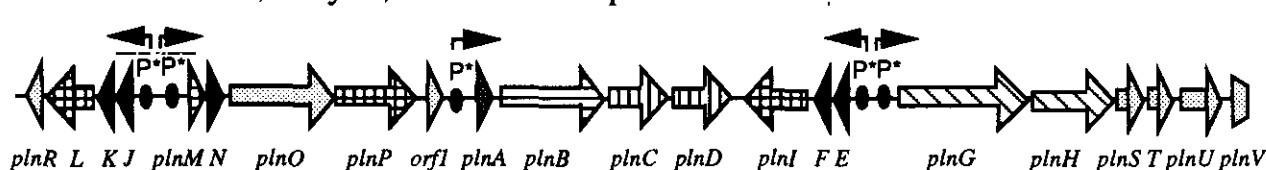


Figura 2.4. Representación esquemática de los clusters génicos involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas de la clase I: nisina (A) y de la clase II: sakacina P (B), sakacina A (C), carnobacteriocinas BM1 y B2 (D) y plantaricinas EF, JK y N (E).

En la parte superior de la figura (A) se muestra la organización del transposón de 70 Kb Tn5276 que contiene los clusters de la nisina (*nis*, caja sombreada, ampliado debajo), sacarosa (*sac*, flechas blancas) y transposición (*xis* e *int*, flechas blancas). Los ORFs aparecen representados por flechas negras (gen estructural), cuadriculadas (gen de inmunidad), sombreadas (factor de inducción), rayadas horizontalmente (histidina-quinasa), rayadas verticalmente (regulador de respuesta), cuadriculadas estilo damero (procesamiento), blancas (modificación posttraduccional), rayadas oblicuamente (transportador), rayadas oblicuamente con negritas (elemento de inserción), punteadas (función desconocida) y truncadas punteadas (incompleto). Los promotores de la transcripción se muestran como círculos negros; P, promotor no regulado, P*, promotor regulado y PP*, hipotético promotor regulado. Fuente: ver texto sección II.4.9.

a la ausencia de un promotor inmediatamente antes de *nisB*, sugiere que la horquilla formada por la secuencia repetida inversa situada entre *nisA/Z* y *nisB* no actúa como una señal terminadora de la transcripción, como propusieron Steen *et al.* (1991), sino que, por el contrario, actúa, como también sugirieron Kuipers *et al.* (1995), como una señal para el procesamiento interno del transcrito *nis(A/Z)BTCIPRK*. Asimismo, De Ruyter *et al.* (1996) confirmaron que, a diferencia de los promotores regulados de *nisA* y *nisF*, el tercer promotor, localizado *upstream* de *nisRK*, dirige la expresión de dichos genes de forma constitutiva. Por otra parte, el análisis y la secuenciación del transcrito correspondiente al operón *nisFEG* permitió a Ra *et al.* (1996) confirmar que el hipotético terminador de la transcripción situado *downstream* de *nisK* es funcional, como ya sugirieron Engelke *et al.* (1994) e Immonen *et al.* (1995).

En lo que respecta a la función específica de los productos de los 11 genes del *cluster* de la nisina se conoce que el gen *nisA*, de 171 pb, codifica un péptido de 57 aminoácidos (prepronisina), que incluye una extensión N-terminal de 23 aa y un dominio propéptidico C-terminal de 34 aa (pronisina); los genes *nisB* y *nisC* codifican proteínas de 993 y 414 aa, respectivamente, posiblemente implicadas en las modificaciones postraduccionales de la nisina, tales como las reacciones de deshidratación de los residuos aminoácidos y la formación de los enlaces tioéter (Engelke *et al.*, 1992); el gen *nisP* codifica un proteasa de 682 aa que parece estar implicada en la liberación de la extensión N-terminal de la prepronisina, es decir, en su procesamiento (Van der Meer *et al.*, 1993); el gen *nisT* codifica una proteína ABC transportadora de 600 aa responsable de la translocación y transporte de la nisina al exterior celular (Engelke *et al.*, 1992); el gen *nisI* codifica una lipoproteína de 245 aa que confiere a la cepa productora inmunidad a la nisina (Kuipers *et al.*, 1993; Engelke *et al.*, 1994); los genes *nisR* y *nisK* codifican, respectivamente, una proteína reguladora de respuesta (RR) de 229 aa y una proteína histidín-quinasa (PHQ) de 447 aa, que juntas constituyen un sistema de transducción de señal de dos componentes que interviene en la regulación de la producción de nisina (Van der Meer *et al.*, 1993; Engelke *et al.*, 1994; Immonen *et al.*, 1995); los genes *nisF*, *nisE* y *nisG* codifican proteínas de 225, 247 y 214 aa, respectivamente, que parecen estar involucradas en el transporte e inmunidad de la nisina (Siegers y Entian, 1995). La proteína NisF presenta dos sitios de unión de ATP y una elevada homología con la proteína ABC transportadora McbF de la microcina B17, por lo que estos autores sugieren que el dominio ATPásico puede formar un complejo de membrana con el dominio hidrofóbico de la proteína E o G y constituir así un sistema de transporte ABC. Por otra parte, la proteína NisG presenta un perfil de hidrofobicidad y una configuración similar a la de las proteínas de inmunidad descritas en algunas colicinas, por lo que podría intervenir junto a la proteína I en la inmunidad a la nisina (Siegers y Entian, 1995).

II.4.9.2. Localización y organización molecular de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la sakacina P

Huhne *et al.* (1996) clonaron y secuenciaron un fragmento de 7,6 Kb del cromosoma de *Lb. sake* Lb674 que contiene los determinantes genéticos asociados a la producción de la sakacina P. La secuencia nucleotídica correspondiente contiene 7 marcos abiertos de lectura completos con la misma polaridad, denominados *orf1*, *sppK*, *sppR*, *sppA*, *spiA*, *sppT*, *sppE*, y un ORF incompleto, denominado *orf2*, situado inmediatamente detrás de *sppE* y con la misma polaridad

(Figura 2.4B). El gen *orf1* se localiza en el extremo 5' del fragmento secuenciado; a continuación se sitúa el gen *sppK* e inmediatamente detrás se encuentra el codon de iniciación de la traducción (TTG) del gen *sppR*. A tres pares de bases del codon de terminación de la traducción de *sppR* se localiza un hipotético terminador simple de la transcripción (terminador *rho*-independiente) con una energía libre de Gibbs (AG) de -18,4 Kcal/mol. A una distancia de 147 pb en dirección 3' del gen *sppR* se localiza el gen estructural de la sakacina P, *sppA*, y, a continuación, el gen *spiA*. *Downstream* de *spiA* se localiza otro hipotético terminador *rho*-independiente con una AG de -19,4 Kcal/mol. *SppT* comienza a 350 pb *downstream* del gen *spiA* y está seguido de *sppE*. Delante de todos los ORF se localizan hipotéticas secuencias de unión al ribosoma (RBS, del inglés, *Ribosome Binding Site*) o secuencias Shine-Dalgarno (S.D.). *Upstream* de los genes *orf1*, *sppA*, *sppT* y *orf2* se han identificado hipotéticos promotores por analogía con la secuencia del promotor consenso de la ARN polimerasa de *E. coli*. (Rosenberg y Court, 1979; Hawley *et al.*, 1983). Estos resultados permiten hipotetizar que los determinantes genéticos del *cluster* asociado a la producción de la sakacina P se organizan en tres operones policistrónicos, el primero constituido por *orf1*, *sppK* y *sppR*, el segundo por *sppA* y *spiA* y el tercero por, al menos, *sppT* y *sppE*. Asimismo, en la región próxima a las regiones -35 de los hipotéticos promotores de *orf1*, *sppA*, *sppT* y *orf2* se localizan secuencias repetidas directas similares a las de las cajas reguladoras descritas por Diep *et al.* (1996).

En lo que respecta a la función específica de los productos de estos genes se conoce que el gen *orf1* codifica un péptido de 36 aa que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina de 17 aa y un dominio C-terminal de 19 aa cuya secuencia corresponde con la secuencia del factor de inducción (ORF1) de la sakacina P purificado del medio de cultivo (Eijsink *et al.*, 1996); los genes *sppK* y *sppR* codifican, respectivamente, una proteína histidina-quinasa de 448 aa y una proteína reguladora de respuesta de 248 aa; así, pues, los genes *orf1*, *sppK* y *sppR* constituyen el operón regulador de la producción de sakacina P. Por otra parte, el gen *sppA* codifica un péptido de 61 aa (preprosakacina P), que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina de 18 aa y un dominio propeptídico C-terminal de 43 aa (prosakacina A); el gen *spiA* codifica una hipotética proteína de 98 aa que confiere inmunidad a la cepa productora frente a la sakacina P. El gen *sppT* codifica una proteína ABC transportadora de 718 aa y, por último, el gen *sppE* codifica una hipotética proteína accesoria de 248 aa (Huhne *et al.*, 1996).

II.4.9.3. Localización y organización molecular de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la sakacina A

Axelsson y Holck (1995) clonaron y secuenciaron un fragmento de 8,6 Kb del plásmido pLSA60 (60 Kb) de *Lb. sake* Lb706 que contiene los determinantes genéticos asociados a la producción de la sakacina A. La secuencia nucleotídica correspondiente contiene dos operones policistrónicos de distinta polaridad (*sapAsaiA* y *orf4sapKRTE*) separados por un elemento de inserción denominado IS1163, que no está involucrado en la expresión de los determinantes genéticos asociados a la producción de sakacina A (Figura 2.4C). Este elemento de inserción pertenece a la familia IS3 pero, a diferencia de otros miembros del grupo, las secuencias repetidas inversas que presenta se localizan en sus extremos y no formando parte del mismo. El primer operón del *cluster*, localizado en la cadena 3' -5', contiene dos ORFs, denominados *sapA*

y *saiA*, y el segundo, localizado en la cadena complementaria, está constituido por 5 ORFs, denominados *ofr4*, *sapK*, *sapR*, *sapT* y *sapE* (Figura 2.4C). El gen *sapA* codifica la sakacina A en forma de preprosakacina A con una secuencia líder del tipo doble glicina de 18 aa y un dominio propeptídico C-terminal de 41 aa (prosakacina A). El gen *saiA* codifica una hipotética proteína de inmunidad de 90 aa. El gen *ofr4* codifica un péptido de 45 aa con una secuencia líder del tipo doble glicina de 22 aa y un dominio C-terminal de 23 aa, que corresponde posiblemente al factor de inducción de la sakacina A. Los genes *sapK* y *sapR* codifican, respectivamente, una proteína histidina-quinasa de 428 aa y una proteína reguladora de respuesta de 247 aa. El gen *sapT* codifica una proteína ABC transportadora de 719 aa y el gen *sapE* codifica una hipotética proteína accesoria de 461 aa. En la región próxima a las secuencias -35 de los hipotéticos promotores de *sapA* y *ofr4* se localizan secuencias repetidas directas similares a las de las cajas reguladoras descritas por Diep *et al.* (1996). Axelsson y Holck (1995) observaron que mutaciones en los genes *sapT* y *sapE* provocaban la aparición del fenotipo Bac- en los hospedadores correspondientes, mientras que mutaciones en los genes *sapK* o *sapR* provocaban además la aparición del fenotipo Inm-. Estos resultados indican que el sistema de regulación de dos componentes es esencial para que tenga lugar la expresión de los dos operones, lo cual permite, a su vez, sugerir que la proteína SapR sea el activador de la transcripción de ambos operones. *Downstream* de *saiA* se localiza otro ORF, denominado *orf1*, que codifica una hipotética proteína de 87 aa, de función desconocida, que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina de 22 aa y un dominio C-terminal de 65 aa con características similares a las de otras probacteriocinas de la clase II.

II.4.9.4. Localización y organización molecular de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de la carnobacteriocinas BM1 y B2

Quadri *et al.* (1995b; 1997b) clonaron y secuenciaron un fragmento de 4,0 Kb del cromosoma y uno de 10,0 Kb del plásmido pCP40 (61 Kb) de *C. piscicola* LV17B que contienen los determinantes genéticos asociados a la producción de las carnobacteriocinas BM1 y B2, respectivamente. El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento cromosómico reveló la presencia de dos ORFs, denominados *cbnBM1* y *cbiBM1*, organizados en un operón (Figura 2.4D). El ORF *cbnBM1* corresponde al gen estructural de la carnobacteriocina BM1 y codifica un prepéptido de 61 aa que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina de 18 aa y un dominio C-terminal de 43 aa (procarnobacteriocina BM1). Asimismo, el gen *cbiBM1* codifica una hipotética proteína de inmunidad de 88 aa.

En lo que respecta a la secuencia nucleotídica del fragmento plasmídico, su análisis permitió identificar 9 ORFs, 7 de ellos organizados con la misma polaridad en dos operones policistrónicos (*cbnSKRTD* y *cbnB2cbiB2*) y los 2 restantes organizados en un operón localizado *upstream* y con distinta polaridad (*orfXY*) (Figura 2.4D). El primer operón del *cluster* contiene los ORFs denominados *cbnS*, *cbnK*, *cbnR*, *cbnT* y *cbnD* y el segundo operón está constituido por *cbnB2* y *cbiB2*. Los genes *cbnS*, *cbnK* y *cbnR* codifican, respectivamente, un prepéptido de 41 aa con una secuencia líder del tipo doble glicina de 17 aa y un dominio C-terminal de 24 aa, una proteína histidina-quinasa de 442 aa y una proteína reguladora de respuesta de 245 aa. La organización de estos tres genes, así como las características de las

proteínas que codifican, es análoga a la observada en otros sistemas de regulación de dos componentes descritos para las bacteriocinas de la clase II (Nes *et al.*, 1996). *Downstream* del gen *cbnR* se localizan los genes *cbnT* y *cbnD* que codifican, respectivamente, una proteína transportadora de 716 aa y una proteína accesoria de 455 aa. El segundo operón contiene el gen estructural de la carnobacteriocina B2 (*cbnB2*), que codifica la preprobacteriocina con una secuencia líder del tipo doble glicina de 18 aa y un dominio C-terminal de 48 aa (procarnobacteriocina B2), y el gen *cbiB2*, que codifica una proteína de 111 aa que confiere inmunidad frente a la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1995a). Por otra parte, los ORFs *orfX* y *orfY*, localizados *upstream* del primer operón, codifican, respectivamente, prepéptidos de 51 y 48 aa de función desconocida y que contienen secuencias líder del tipo doble glicina similares a las de las bacteriocinas de la clase II y sus factores de inducción. En la región próxima a las regiones -35 de los promotores de los ORFs *cbnBM1*, *cbnS*, *cbnB2* y *cbnX* se han identificado secuencias repetidas directas similares a las de las cajas reguladoras descritas por Diep *et al.* (1996).

II.4.9.5. Localización y organización molecular de los determinantes genéticos asociados a la biosíntesis de las plantaricinas EF y JK

Diep *et al.* (1996) clonaron y secuenciaron un fragmento de 16,5 Kb del cromosoma de *Lb. plantarum* C11 que contiene los determinantes genéticos asociados a la producción de las plantaricinas EF, JK y N. Este fragmento contiene un *cluster* con 22 ORF, de los cuales 21 están agrupados en cinco operones policistrónicos (*plnJKRL*, *plnMNOP*, *plnABCD*, *plnEFI* y *plnGHSTUV*) (Figura 2.4E). Los operones *plnJKRL* y *plnEFI* se localizan en la cadena 3'-5' y los operones *plnMNOP*, *plnABCD*, *plnGHSTUV*, así como el *orfI* localizado entre *plnMNOP* y *plnABCD*, se sitúan en la cadena complementaria. En la región próxima a las secuencias -35 de los promotores de los cinco operones se han identificado cajas reguladoras constituidas por dos secuencias repetidas directas de 9 nucleótidos separadas por un 12 nucleótidos.

PlnABCD es el operón autorregulador del sistema de las plantaricinas (Diep *et al.*, 1994; 1995). El ORF *plnA* codifica el factor de inducción en forma de un prepéptido de 48 aa con una secuencia líder del tipo doble glicina de 22 aa y un dominio C-terminal de 26 aa que corresponde al factor de inducción activo (plantaricina A, PlnA) (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998). Los ORFs *plnB*, *plnC* y *plnD*, situados *downstream* de *plnA*, codifican una proteína histidinaquinasa de 442 aa (PlnB) y dos proteínas reguladoras de respuesta de 247 aa cada una (PlnC y PlnD); estas tres proteínas constituyen un sistema de regulación de dos componentes y, posiblemente, desempeñan un papel crucial ya que, mediante la modulación de la concentración de factor de inducción, controlarían la expresión de los restantes operones asociados a la producción de las plantaricinas.

En los operones denominados *plnEFI* y *plnJKRL* se localizan los cuatro genes estructurales (*plnE*, *plnF*, *plnJ* y *plnK*) que codifican los dos sistemas de dos péptidos identificados en *Lb. plantarum* C11, así como los genes *plnL* y *plnI* que codifican sus hipotéticas proteínas de inmunidad. *PlnE* y *plnF* codifican prepéptidos con secuencias líder del tipo doble glicina de 23 y 18 aa, respectivamente, y con dominios C-terminales de 33 y 34 aa, respectivamente, cuyas secuencias aminoacídicas son idénticas a las obtenidas tras purificar del medio de cultivo las dos

bacteriocinas que constituyen el sistema de la plantaricina E (PlnE y PlnF) (Anderssen *et al.*, 1998); asimismo, *plnI* codifica una hipotética proteína de inmunidad de 257 aa. Por otra parte, *plnJ* y *plnK* codifican pre péptidos con secuencias líder del tipo doble glicina de 30 y 25 aa, respectivamente, y con dominios C-terminales de 25 y 32 aa, respectivamente, cuyas secuencias aminoacídicas son idénticas a las obtenidas tras purificar del medio de cultivo las dos bacteriocinas que constituyen el sistema de la plantaricina J (PlnJ y PlnK) (Anderssen *et al.*, 1998); *plnL* codifica una hipotética proteína de inmunidad de 138 aa y *plnR*, situado inmediatamente *downstream* de *plnL*, codifica una proteína de 50 aa de función desconocida (Diep *et al.*, 1996).

En lo que respecta al operón *plnMNOP*, los ORFs *plnM* y *plnN* codifican, respectivamente, péptidos de 66 y 55 aa (PlnM y PlnN) que, al igual que las bacteriocinas de la clase II, son catiónicos e hidrófobos; no obstante, únicamente PlnN se sintetiza en forma de pre péptido con una secuencia líder del tipo doble glicina de 25 aa. Recientemente, Anderssen *et al.* (1998) han purificado PlnN del medio de cultivo de *Lb. plantarum* C11 y han comprobado que el péptido sintético carece de actividad antimicrobiana. Por otra parte, *plnO* y *plnP* codifican proteínas de 399 y 247 aa, respectivamente. Las hipotéticas PlnP y PlnM presentan características físico-químicas similares a las de la proteína de inmunidad PlnI (péptidos hidrófobos con elevado pI), lo que sugiere que podrían estar involucrada en el mecanismo de inmunidad; por el contrario, PlnO es una proteína hidrofílica con bajo pI (5,27) y de función desconocida (Diep *et al.*, 1996).

Finalmente, en el operón *plnGHSTUV* se localizan los determinantes genéticos que codifican la maquinaria responsable del procesamiento y transporte de los 6 péptidos con secuencias líder del tipo doble glicina producidos por *Lb. plantarum* C11 (PlnA, PlnE, PlnF, PlnJ, PlnK, PlnN). Los ORFs *plnG* y *plnH* codifican, respectivamente, una proteína ABC transportadora de 716 aa y una proteína accesoria de 457 aa. En lo que respecta a los otros 3 ORFs completos *plnS*, *plnT* y *plnU* y al ORF incompleto *plnV*, situados *downstream* de *plnG*, así como al ORF *orfI*, localizado entre *plnMNOP* y *plnABCD*, codifican las hipotéticas proteínas de función desconocida PlnS (140 aa), PlnT (99 aa), PlnU (222 aa), PlnV (al menos 44 aa) y ORF1 (62 aa), respectivamente (Diep *et al.*, 1996).

CAPÍTULO III.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. CEPAS BACTERIANAS

III.1.1.1. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas caracterizadas en este trabajo se aislaron de embutidos crudos curados (chorizos caseros) donados altruistamente por particulares de diversas localidades de la geografía Española. La elaboración de los embutidos se realizó según las costumbres gastronómicas típicas de los lugares de origen y de modo artesanal, es decir, sin la adición intencionada de cultivos iniciadores, conservantes o aditivos, a excepción de la sal y de las especias.

III.1.1.2. Microorganismos indicadores

Las cepas bacterianas empleadas como microorganismos indicadores para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas, así como su origen y las condiciones empleadas para su incubación, se muestran en la Tabla III.1. La mayor parte de las cepas bacterianas procedían de cultivos de colección, si bien, algunas de las bacterias lácticas habían sido aisladas de embutidos crudos curados (chorizos caseros) por otros investigadores del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Moreira, 1993; Sobrino *et al.*, 1992; Sobrino, 1993; Cintas, 1995).

III.1.1.3. Bacterias empleadas en las experiencias genéticas

La cepa *E. coli* DH5 α empleada como hospedador en los experimentos de transformación química fue suministrada por el Dr. Ingolf F. Nes y forma parte de la colección de cultivos bacterianos del Laboratorio de Tecnología Genética Microbiana de la Universidad Agrícola de Noruega, en el que se realizaron algunas de las experiencias bioquímicas y las de genética microbiana expuestas en este trabajo.

La cepa *E. faecium* CTC492, empleada en algunas experiencias de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, fue aislada de un embutido crudo curado (salchichón) y caracterizada bioquímica y genéticamente por Teresa Aymerich (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

III.1.2. ÁCIDOS NUCLEICOS

III.1.2.1. Plásmidos

El fagémido pBluescript II SK+, de 2.961 pb, derivado del plásmido pUC19 (Vieira y Messing, 1982) empleado como vector de ligación fue suministrado por "Stratagene". Este fagémido contiene el replicón del plásmido ColE1, el origen de replicación del bacteriófago filamentoso f1, el factor de resistencia a la ampicilina y un fragmento de ADN del gen *lacZ* de *E. coli* que codifica el fragmento amino-terminal de la β -galactosidasa (inactivo enzimáticamente). En el gen defectivo *lacZ* se encuentra integrado un poliengarce (*polilinker*), es decir, un fragmento con 21 dianas de diferentes enzimas de restricción, que constituye el punto de clonación donde se inserta el fragmento de ADN exógeno.

Tabla III.1. Microorganismos indicadores empleados en este trabajo

| Microorganismo | Indicador | Cepa | Origen ^a | Condiciones de incubación | |
|------------------------------------------|-----------|----------|---------------------------------|---------------------------|-------------|
| | | | | Medio | Temperatura |
| Bacterias Gram-positivas | | | | | |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | | 4356 | ATCC | MRS | 37 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (1) | | 11842 | ATCC | MRS | 42 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | | 334 | ATCC | MRS | 37 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | | 2739 | NCFB | MRS | 32 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | | 9338 | ATCC | MRS | 37 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | | 15009 | ATCC | MRS | 42 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | | 1193 | NCDO | MRS | 37 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | | 20016 | DSM | MRS | 37 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | | 148 | Sobrinho <i>et al.</i> , (1992) | MRS | 32 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | | 2714 | NCFB | MRS | 32 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | | 2747 | NCFB | MRS | 37 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | | 347 | Moreira (1993) | MRS | 32 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | FBB61 | TNO | MRS | 32 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | FBB63 | TNO | MRS | 32 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | PC1 | TNO | MRS | 32 |
| <i>Lactococcus cremoris</i> (2) | | CNRZ117 | INRA | MRS | 32 |
| <i>Lactococcus lactis</i> (3) | | CNRZ148 | INRA | MRS | 32 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | | CNRZ150 | INRA | MRS | 32 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | | BB24 | Cintas (1995) | MRS | 32 |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | | DB1 | TNO | MRS | 25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | | EF | TNO | MRS | 32 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | | L50 | Cintas <i>et al.</i> , (1995) | MRS | 32 |
| <i>Micrococcus varians</i> | | 230 | CECT | MRS | 37 |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> | | MC1 | TNO | BHI | 37 |
| <i>Listeria innocua</i> | | BL/8626 | TNO | BHI | 32 |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | | C22/10 | TNO | RCM | 37 (A) |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | | 3,5CT | TNO | RCM | 37 (A) |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | | 1754 | NCDO | RCM | 37 (A) |
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | | 563 | NCDO | GYEL | 32 (A) |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | | P4 | TNO | GYEL | 32 (A) |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | | P6 | TNO | GYEL | 32 (A) |
| <i>Bacillus cereus</i> | | 9139 | ATCC | BHI | 37 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | | 376 | CECT | RCM | 37 (A) |
| <i>Clostridium botulinum</i> | | 551 | CECT | RCM | 37 (A) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | 7973 | NCTC | BHI | 32 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | LI5sv1/2 | FVM | BHI | 32 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | 5105 | NCTC | BHI | 32 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | LI1sv4 | FVM | BHI | 32 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | ScottA | FVM | BHI | 32 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | 137 | FRI | BHI | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | 196E | FRI | BHI | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | 349 | FRI | BHI | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | 361 | FRI | BHI | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | 472 | FRI | BHI | 37 |
| Bacterias Gram-negativas | | | | | |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | 398 | CECT | BHI | 37 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | | 684 | CECT | BHI | 37 |
| <i>Escherichia coli</i> | | 731 | CECT | BHI | 37 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | | 2085 | CECT | BHI | 37 |
| <i>Salmonella thyphimurium</i> | | 443 | CECT | BHI | 37 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | | 559 | CECT | BHI | 37 |

^aAbreviaturas: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, USA); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Burjassot, Valencia); DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Culturen (Braunschweig, Alemania); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); FVM, Facultad de Veterinaria de Madrid (Madrid); INRA, Station of researchers Laitieres (Jou-en-Josas Cedex, Francia); NCFB y NCDO, National Collection of Food Bacteria (Reading, UK); NCTC, National Collection of Type Cultures (London, UK); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, Holanda); (A): incubación bajo condiciones de anaerobiosis. (1) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; (2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*L. cremoris*); (3) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*L. lactis*)

III.1.2.2. Oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primeros)

Los oligonucleótidos degenerados o específicos diseñados en este trabajo fueron construidos en un sintetizador automático por la firma comercial "KEBO-Lab" (Cell & Molecular Biology, Spanga, Sweden). Los cebadores se recibían purificados y disueltos en 1,5 ml de agua destilada y preparados para ser empleados directamente en cualquiera de las modalidades de PCR y en las reacciones de secuenciación. En la Tabla III.2 se muestran los cebadores utilizados en este trabajo.

III.1.2.3. Marcadores de tamaño molecular

III.1.2.3.1. Escalera de fragmentos circulares de ADN (plásmidos)

Los patrones de tamaño molecular conocido empleados en las electroforesis del ADN plasmídico fueron suministrados por la firma "Gibco-BRL" y consistían en formas circulares superenrolladas de ADN (ADNcc), con tamaños moleculares de 16.210, 14.174, 12.138, 10.102, 8.066, 7.045, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972 y 2.067 pb. El contenido del vial (25 µg) se resuspendió en 100 µl de tampón de Tris-HCl 10mM pH 8,0, 1mM EDTA y se conservó a -20°C.

III.1.2.3.2. Escalera de fragmentos lineales de ADN

Los marcadores de referencia empleados en las electroforesis de fragmentos lineales de ADN fueron suministrados por las casas comerciales "Gibco-BRL" y "NEB" (New England Biolabs). Los marcadores de "Gibco-BRL" consistían en formas lineales de ADN con tamaños moleculares de 12.216, 11.196, 10.190, 9.162, 8.140, 7.126, 6.106, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 506-517, 396, 344, 296, 220, 202, 156, 136 y 75 pb. Los marcadores de "NEB" consistían en fragmentos de ADN lineal con tamaños moleculares de 622, 527, 404, 307, 242, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76 y 67 pb. El contenido de los viales (25 µg) se resuspendió en 100 µl de tampón Tris-HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, 0,1mM EDTA y se conservaron a -20°C.

III.1.3. ENZIMAS Y PROTEÍNAS

Los enzimas empleados para la caracterización bioquímica de las bacteriocinas fueron los siguientes:

- Tripsina (EC 3.4.21.4) "Merck", extraída de páncreas bovino.
- Papaína (EC 3.4.22.2) "Merck", extraída de látex de papaya.
- Pepsina (EC 3.4.23.1) "Merck", extraída de mucosa porcina.
- Proteasa II (EC 3.4.24.4) "Sigma", producida por *Aspergillus oryzae*.
- Proteasa VI (EC 3.4.24.4) "Sigma", producida por *Streptomyces griseus*.
- Proteasa XIV (EC 3.4.24.4) (Pronasa E) "Sigma", producida por *Streptomyces griseus*.
- α-amilasa (EC 3.2.1.1) "Boehringer", producida por *Bacillus amyloliquefaciens*.
- Lipasa I (EC 3.1.1.3) "Sigma", extraída de germen de trigo.
- Lipasa VII (EC 3.1.1.3) "Sigma", producida por *Candida cylindracea*.

La seroalbúmina bovina fracción 5 (SAB) empleada como patrón para determinar la

Tabla III.2. Oligonucleótidos sintéticos empleados en este trabajo para los experimentos de PCR y de secuenciación genética

| Nombre | Empleo | Secuencia nucleotídica (5' - 3') | Tm (°C) |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------------------------|---------|
| ENTP1 (d) | PCR _H SEQ | TGY TGG GTI AAY TGG GGI GAR GC | 60,7 |
| ENTP2 | PCR _{H,N} SEQ | GAT TTA TTA CTT TTC ATA GTA TTA ATG TCC | 54,5 |
| ENTP3 | PCR _{H,N} SEQ | CCA GCA TTT ACT ATT ATT ACA ATA AAC ACC ATT ACC | 60,8 |
| ENTP4 | SEQ | CTC ATT TGT ATT CTT CGG GGA ATT AAT TCA TTC C | 61,7 |
| ENTP5 | PCR _N SEQ | CTT TCA ACA AAG TTC TAG AAT TAA CTG AAA CAG C | 60,5 |
| ENTB1 (d) | PCR _{E,H} SEQ | AAY GAY CAY MGN ATG CC | 51,0 |
| ENTB2 (d) | PCR _E | AAN ARN CCN CCN GCG AT | 53,0 |
| ENTB3 | PCR _{E,H} SEQ | AGA CCT AAC AAC TTA TCT AAA G | 50,7 |
| ENTB4 | PCR _H | GCG ATT GCA GCA CCA CAT TTT G | 58,1 |
| ENTB5 | PCR _{E,H} SEQ | GTT GCA TTT AGA GTA TAC ATT TGC | 53,6 |
| ENTA1 (TH10) | PCR _{E,H} SEQ | GAT TAT GAA ACA TTT AAA AAT TTT GTC | 55,0 |
| ENTA2 | PCR _E | AAA ACC ACC TAT AGA CAT TCC TGC | 57,0 |
| SK2 (bio) | PCR _{H,N} SEQ | CCG CTC TAG AAC TAG TGG ATC | 54,2 |
| TH8 | PCR _N SEQ | CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG | 60,7 |

Abreviaturas: Tm (°C), temperatura de fusión del ADN; (d), oligonucleótido degenerado; (bio), oligonucleótido biotinizado; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; la modalidad de PCR se indica con los subíndices: E, específico; H, hemiespecífico; N, anidado; SEQ, reacciones de secuenciación. Los desoxinucleótidos con las diferentes bases nitrogenadas del ADN se indican como: A, adenina, C, citosina, G, guanina, T, timina; Y (C, T); R (A, G); M (C, A); N (A, C, G, T); I, base universal inosina; Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados por la autora, a excepción del ENTA1 (TH10) (Aymerich, 1996) y el TH8 y SK2, cuyas secuencias son específicas del vector comercial pBluescript II SK+.

concentración de bacteriocina en las muestras purificadas fue suministrada por "Pierce-Chemicals".

La lisozima y ARNasa utilizadas en los procedimientos de aislamiento de ADN bacteriano procedían de las casas comerciales "Serva" y "Sigma", respectivamente. Los enzimas de restricción empleados para la digestión del ADN y sus correspondientes tampones se citan a continuación:

- *DraI*, producido por *Deinococcus radiophilus*. Tampón 4 (10x: acetato potásico 50 mM, Tris acetato 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio 10 mM, DDT 1 mM). Ambos se adquirieron de "NEB".
- *HincII*, producido por *Haemophilus influenzae*. Tampón B (10x: Tris-HCl 10mM, pH 7,4, NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, ditionitrol (DTT) 1mM, 0,5 mg/ml BSA, 50% glicerol). Suministrados por "Promega".
- *RsaI*, producido por *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Tampón C (10x: Tris-HCl 10mM, pH 7,4, NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,5 mg/ml BSA, 50% glicerol). Suministrados por "Promega".
- *SspI*, producido por una cepa de *E. coli* que tiene clonado el gen *SspI* de *Sphaerotilus* sp ATCC13925. Tampón *SspI* (10x: NaCl 50 mM, Tris-HCl 100mM, $MgCl_2$ 10 mM, 0,025% Tritón X-100, pH 7,5). Suministrados por "NEB".
- *NaeI*, producido por una cepa de *E. coli* que tiene clonado el gen *NaeI* de *Nocardia aerocoloniges*. Tampón 1 (10x: Tris Propano-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DDT 1 mM, pH 7,0). Suministrados por "NEB".
- *FspI*, producida por una cepa de *E. coli* que tiene clonado el gen *FspI* de *Fischerella* sp. Tampón 4 (10x: acetato potasico 50 mM, Tris acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, DDT 1 mM, pH 7,5). Suministrados por "NEB".
- *StuI*, producido por *Streptomyces tubercidicus*. Tampón 2 (10x: NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DDT 1 mM, pH 7,5). Suministrados por "NEB".
- *EcoRI*, producida por una cepa de *E. coli* que tiene clonado el gen *EcoRI* de *E. coli* RY13. Tampón NEB *EcoRI* (10x: Tris -HCl 100 mM, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, 0,025% Triton X-100, pH 7,5). Suministrados por "NEB".

El enzima empleado en las reacciones de amplificación del ADN mediante la técnica de PCR fue la ADN polimerasa *Taq*, obtenida de la bacteria termófila *Thermus* sp. El enzima fue suministrado por la casa "Advanced Biotechnologies LTD".

Para la conversión de los extremos cohesivos protuberantes de los fragmento amplificados por PCR en extremos planos, se empleó el fragmento grande o fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, con su correspondiente tampón 10x (Tris-HCl 500 mM, pH 7,2, $MgSO_4$ 100 mM, DDT 1 mM), suministrados por "Promega".

La desfosforilación de los grupos 5' fosfato del fagémido tratado con enzimas de restricción se realizó con el enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero y el tampón CIP 10x (Tris-HCl 500 mM, pH 9,3, $MgCl_2$ 10 mM, $ZnCl_2$ 1 mM, espermidina 10 mM), suministrados por "Promega".

En las experiencias de ligación se empleó el enzima T4 ADN ligasa y su correspondiente tampón 10x (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8, $MgCl_2$ 100 mM, DDT 100 mM y ATP 5 mM),

suministrados por "Promega".

La secuenciación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo empleando una variante modificada genéticamente del enzima ADN polimerasa del bacteriófago T7, el enzima ADN polimerasa T7 Sequenasa 2.0, y su correspondiente tampón de dilución 8x (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, DTT 5mM y BSA 0,5 mg/ml), incluidos ambos en el *kit* suministrado por "United States Biochemicals" ("USB").

III.1.4. MEDIOS DE CULTIVO

Los componentes minerales, azúcares, suplementos, aminoácidos y antibióticos empleados en la preparación de los medios de cultivo procedían de las casas comerciales "Oxoid", "Merck", "Sigma", "Fluka" y "Panreac".

III.1.4.1. Medios de cultivo empleados para el aislamiento y crecimiento de las bacterias lácticas

III.1.4.1.1. Medio de mantenimiento (MM)

Composición en g/l:

| | |
|-------------------------|-----|
| Bacto Peptona ("Difco") | 1,0 |
| Cloruro sódico | 8,5 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 1.000 ml de agua destilada y se calienta en una placa calefactora hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.1.2. Caldo nutritivo de Man. Rogosa y Sharpe (MRS, "Oxoid")

Composición en g/l:

| | |
|----------------------------------------|---------|
| Peptona | 10,00 |
| Polvo "Lab Lemco" | 8,00 |
| Extracto de levadura | 4,00 |
| Glucosa | 20,00 |
| Acetato sódico ($\cdot 3H_2O$) | 5,00 |
| Fosfato dipotásico | 2,00 |
| Citrato triamónico | 2,00 |
| Sulfato magnésico ($\cdot 7H_2O$) | 0,20 |
| Sulfato de manganeso ($\cdot 4H_2O$) | 0,05 |
| Tween 80 | 1,00 ml |
| pH | 6,2 |

Preparación:

Para rehidratar el medio se suspenden 52 g en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. Para preparar los correspondientes medios semisólido (agar semisólido MRS) y sólido (agar sólido MRS) se adicionan además 7,5 y 15 g de agar bacteriológico ("Difco"), respectivamente. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.1.3. Caldo MRS para lactobacilos (MRS, "Difco")

Composición en g/l:

| | |
|-------------------------|-------|
| Bacto peptona | 10,00 |
| Bacto extracto de carne | 10,00 |

| | |
|----------------------------------------|-------|
| Bacto extracto de levadura | 5,00 |
| Bacto dextrosa | 20,00 |
| Acetato sódico ($\cdot 3H_2O$) | 5,00 |
| Fosfato disódico | 2,00 |
| Citrato amónico | 2,00 |
| Sulfato magnésico ($\cdot 7H_2O$) | 0,10 |
| Sulfato de manganeso ($\cdot 4H_2O$) | 0,05 |
| Tween 80 | 1,00 |
| pH | 6,5 |

Preparación:

Para rehidratar el medio se suspenden 55 g en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.2. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de los microorganismos indicadores distintos a las bacterias lácticas

III.1.4.2.1. Caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, "Oxoid")

Composición en g/l:

| | |
|---------------------|------|
| Extracto de cerebro | 12,5 |
| Extracto de corazón | 5,0 |
| Proteosa-peptona | 5,0 |
| Dextrosa | 2,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Fosfato disódico | 2,5 |
| pH | 7,4 |

Preparación:

Se suspenden 37 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Para la preparación de los ágaros sólidos y semisólidos BHI se procede de manera análoga a la descrita en la sección III.1.4.1.2.

III.1.4.2.2. Medio reforzado para clostridios (RCM, "Oxoid")

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|------|
| Lab-Lemco Powder | 10,0 |
| Peptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 3,0 |
| Glucosa | 5,0 |
| Almidón | 1,0 |
| Acetato sódico | 3,0 |
| Cisteína-HCl | 0,5 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Agar | 0,5 |
| pH | 6,7 |

Preparación:

Para rehidratar el medio se suspenden 38 g en 1.000 ml de agua destilada, calentando hasta su disolución. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min. Los ágaros sólidos y semisólidos RCM se preparan de manera análoga a la descrita en la sección III.1.4.1.2.

III.1.4.2.3. Caldo de glucosa y extracto de levadura (GYELemco)

Composición en g/l:

| | |
|--------------------------|------|
| Lab-Lemco Powder (Oxoid) | 10,0 |
| Peptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 3,0 |
| Dextrosa | 5,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| pH | 7,0 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 1.000 ml de agua destilada, calentando hasta su completa disolución. Una vez enfriado el medio a temperatura ambiente se ajusta el pH con HCl 1N. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min. Los ágaros sólidos y semisólidos GYELemco se preparan de manera análoga a la descrita en la III.1.2.1.2.

III.1.4.3. Medios empleados para la conservación de las cepas bacterianas**III.1.4.3.1. Medios glicerizados**

Los medios glicerizados son los caldos nutritivos descritos en las secciones III.1.4.1 y III.1.4.2, a los que, una vez que se han desarrollado en ellos los microorganismos correspondientes, se les adiciona como agente crioprotector glicerol (15% v/v) ("Merck") esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.4.3.2. Litmus milk ("Oxoid") al 10% (p/v) (Medio de Leche desnatada)

Composición en g/l:

| | |
|--------------------------|--------|
| Leche desnatada en polvo | 100,0 |
| Litmus | trazas |

Preparación:

Se disuelven 100 g del medio en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 5 min.

III.1.4.4. Medios de cultivo y reactivos empleados para la identificación y caracterización microbiológica y bioquímica de las bacterias lácticas**III.1.4.4.1. Reactivos empleados para la tinción de Gram****III.1.4.4.1.1. Solución de cristal violeta**

| | |
|---------------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Cristal violeta | 2,0 |
| Oxalato amónico | 0,8 |
| Alcohol etílico (95% v/v) | 20,0 ml |

Preparación:

Se suspende el cristal violeta en el alcohol etílico y el oxalato amónico en 80 ml de agua destilada. Una vez homogeneizadas las soluciones, se mezclan, dejándose reposar durante 24 horas antes de su empleo.

III.1.4.4.1.2. Solución de yodo

| | |
|-----------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Yodo | 1,0 |
| Yoduro potásico | 2,0 |

Preparación:

Se tritura el yoduro potásico en un mortero, añadiendo durante la operación una pequeña cantidad de agua. Una vez disuelto, se adiciona el yodo y la solución se trasvasa a un matraz aforado y se enrasa hasta 100 ml con agua destilada.

III.1.4.4.1.3. Colorante de contraste

| | |
|---------------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Safranina O | 0,25 |
| Alcohol etílico (96% v/v) | 10,00 ml |

Preparación:

Se suspende la safranina en el alcohol etílico y, una vez homogeneizada, se añaden 90 ml de agua destilada.

III.1.4.4.2. Caldo MRS ("Oxoid")

Ver sección III.1.4.1.2.

III.1.4.4.3. Caldo CS-T modificado y Agar bacteriológico (0,75% p/v)**III.1.4.4.3.1. Caldo CS-T modificado****Composición en g/l :**

| | |
|----------------------------------------|--------|
| Hidrolizado de caseínas | 5,00 |
| Extracto de levadura | 5,00 |
| Fosfato monopotásico | 0,60 |
| Fosfato dipotásico | 0,60 |
| Sulfato magnésico ($\cdot 7H_2O$) | 0,20 |
| Sulfato de manganeso ($\cdot 1H_2O$) | 0,05 |
| Sulfato ferroso | 0,01 |
| Cloruro sódico | 0,01 |
| Bromotimol azul | 0,08 |
| Bacto agar | 2,50 |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| pH | 6,2 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 900 ml de agua destilada, se calienta hasta su disolución y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Separadamente, se prepara una solución de glucosa al 10% (p/v), que se esteriliza con filtros de 0,22 μm de diámetro de poro y se añade al medio de cultivo en una proporción del 10% (v/v).

III.1.4.4.3.2. Agar bacteriológico (0,75% p/v)

Se suspenden 7,5 g de agar bacteriológico en 1.000 ml de agua destilada y se calienta la solución hasta la homogeneización del agar. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.4.4. Caldo MR-VP ("Difco"), solución de Rojo de metilo y solución de hidróxido potásico

III.1.4.4.4.1. Caldo MR-VP

Composición en g/l:

| | |
|--------------------|-----|
| Bacto peptona | 7,0 |
| Fosfato dipotásico | 5,0 |
| Dextrosa | 5,0 |
| pH | 6,9 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 1.000 ml de agua destilada; una vez disueltos, se esteriliza el medio en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.4.4.2. Solución de Rojo de metilo

Contiene:

| | |
|---------------------------|----------|
| Rojo de metilo | 0,1 g |
| Alcohol etílico (95% v/v) | 300,0 ml |

Preparación:

Se suspende el reactivo en el alcohol etílico y, una vez disuelto, se trasvasa a un matraz aforado de 500 ml y se enrasa con agua destilada.

III.1.4.4.4.3. Solución de hidróxido potásico 1,78M

Contiene: g/100ml

| | |
|--------------------|------|
| Hidróxido potásico | 10,0 |
|--------------------|------|

Preparación:

Se suspenden las lentejas de sosa en 80 ml de agua desionizada y la solución resultante se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada.

III.1.4.4.5. Caldo Arginina y Reactivo de Nessler

III.1.4.4.5.1. Caldo arginina

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona | 10,00 |
| Extracto de levadura | 4,00 |
| Acetato sódico | 5,00 |
| Citrato sódico | 2,00 |
| Fosfato dipotásico | 2,00 |
| Sulfato magnésico | 0,20 |
| Sulfato de manganeso | 0,02 |
| L-Arginina | 3,00 |
| Tween 80 | 1,00 ml |

Preparación:

Se disuelven los componentes en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. El medio se distribuye en tubos de 10 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.4.5.2. Reactivo de Nessler

Se preparan las siguientes soluciones:

a) Solución A

Contiene:

| | |
|--------------------|---------|
| Yoduro potásico | 7,0 g |
| Yoduro de mercurio | 10,0 g |
| Agua destilada | 40,0 ml |

b) Solución B

Contiene:

| | |
|------------------|---------|
| Hidróxido sódico | 10,0 g |
| Agua destilada | 50,0 ml |

Preparación:

Una vez atemperada la solución B se mezcla con la A y se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml, enrasándose después con agua destilada. La solución resultante se deja reposar a temperatura ambiente hasta que aparece un sedimento y entonces se decanta el sobrenadante y se esteriliza con filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro.

III.1.4.4.6. Medio base de descarboxilasa de Moeller ("Difco")

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|-------|
| Bacto peptona | 5,00 |
| Extracto de carne | 5,00 |
| Dextrosa | 0,50 |
| Bromo cresol púrpura | 0,01 |
| Rojo cresol | 0,005 |
| Piridoxal | 0,005 |
| pH | 6,0 |

Preparación:

Se suspenden 10,5 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada, se calienta hasta su disolución y, posteriormente, se añaden 10 g de L-arginina. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 10 min.

III.1.4.4.7. Caldo MRS suplementado con diversas concentraciones de cloruro sódico

Se prepara caldo MRS, como se describió en la sección III.1.4.1.2, pero añadiendo además un 6,5 o un 10% de cloruro sódico.

III.1.4.4.8. Agar con hierro de Kligler ("Oxoid")

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|-------|
| Lab lemco | 3,00 |
| Extracto de levadura | 3,00 |
| Peptona | 20,00 |
| Cloruro sódico | 5,00 |
| Lactosa | 10,00 |
| Dextrosa | 1,00 |
| Citrato férrico | 0,30 |
| Tiosulfato de sodio | 0,30 |
| Rojo de fenol | 0,05 |

| | |
|------|-------|
| Agar | 12,00 |
| pH | 7,4 |

Preparación:

Se suspenden 55 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada con un fondo aproximado de 2,5 cm.

III.1.4.4.9. Medio Api 50 CHL y Galerías Api 50 CH ("Biomérieux")**III.1.4.4.9.1. Medio Api 50 CHL**

El medio Api 50 CHL fue suministrado en ampollas de 10 ml.

Composición en g/l :

| | |
|----------------------------------------|----------|
| Peptona | 10,00 |
| Extracto de levadura | 5,00 |
| Tween 80 | 1,00 ml |
| Fosfato dipotásico | 2,00 |
| Acetato sódico ($\cdot 3H_2O$) | 5,00 |
| Citrato diamónico | 2,00 |
| Sulfato magnésico ($\cdot 7H_2O$) | 0,20 |
| Sulfato de manganeso ($\cdot 4H_2O$) | 0,05 |
| Bromocresol púrpura | 0,17 |
| Agua destilada hasta | 1.000 ml |
| pH | 6,9-7,0 |

III.1.4.4.9.2. Galerías Api 50 CH

Las galerías están formadas por 50 microtubos API distribuidos en 5 columnas con 10 filas cada una. El primer tubo (columna 1, fila 0), sin principio activo, sirve como control negativo y cada uno de los siguientes contienen un hidrato de carbono diferente.

- Columna nº 1 (tubo/sustrato): 0. control; 1. glicerol; 2. eritritol; 3. D-arabinosa; 4. L-arabinosa; 5. ribosa; 6. D-xilosa; 7. L-xilosa; 8. adonitol y 9. β -metil-xilósido.
- Columna nº 2 (tubo/sustrato): 10. galactosa; 11. glucosa; 12. fructosa; 13. manosa; 14. sorbosa; 15. ramnosa; 16. dulcitol; 17. inositol; 18. manitol y 19. sorbitol.
- Columna nº 3 (tubo/sustrato): 20. α -metil-D-manósido; 21. α -metil-D-glucósido; 22. N-acetil-glucosamina; 23. amigdalina; 24. arbutina; 25. esculina; 26. salicina; 27. celobiosa; 28. maltosa y 29. lactosa.
- Columna nº 4 (tubo/sustrato): 30. melibiosa; 31. sacarosa; 32. trehalosa; 33. inulina; 34. melecitosa; 35. rafinosa; 36. almidón; 37. glucógeno; 38. xilitol y 39. gentibiosa.
- Columna nº 5 (tubo/sustrato): 40. D-turanosa; 41. D-lixosa; 42. D-tagatosa; 43. D-fucosa; 44. L-fucosa; 45. D-arabitol; 46. L-arabitol; 47. gluconato; 48. 2-cetogluconato y 49. 5-cetogluconato.

III.1.4.4.10. Caldo con Azida sódica y Violeta Etlica (Bacto EVA Broth. "Difco")

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|---------|
| Triptosa | 20,0 |
| Dextrosa | 5,0 |
| Fosfato dipotásico | 2,7 |
| Fosfato monopotásico | 2,7 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Azida sódica | 0,4 |
| Violeta etflica | 0,00083 |
| pH | 7,0 |

Preparación:

Se disuelven 35,8 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. El medio se dispensa en tubos de 10 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.4.11. Agar manitol sal ("Difco")**Composición en g/l:**

| | |
|-------------------|-------|
| Proteasa peptona | 10,00 |
| Extracto de carne | 1,00 |
| D-Manitol | 10,00 |
| Cloruro sódico | 75,00 |
| Agar | 15,00 |
| Rojo de fenol | 0,025 |
| pH | 7,4 |

Preparación:

Se suspenden 111 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez enfriado (50-55°C) se preparan placas con aproximadamente 20 ml de este medio.

III.1.4.4.12. Caldo con verde brillante y sales biliares (2% p/v) ("Oxoid")**Composición en g/l:**

| | |
|-----------------|--------|
| Peptona | 10,0 |
| Lactosa | 10,0 |
| Sales biliares | 20,0 |
| Verde brillante | 0,0133 |
| pH | 7,4 |

Preparación:

Se disuelven 40 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. El medio se distribuye en tubos de 10 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.4.13. Agar sangre base ("Difco")**Composición en g/l:**

| | |
|----------------|-------|
| BHI | 500,0 |
| Bacto triptosa | 10,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Bacto agar | 15,0 |
| pH | 6,8 |

Preparación:

Se suspenden 38 g del medio deshidratado en 950 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min y, seguidamente, se mantiene en un baño de agua termostatado a 50°C. Una vez atemperado el agar sangre base, se le incorporan 50 ml de sangre de carnero desfibrinada ("Oxoid") y se preparan placas de Petri con 20 ml de este medio.

III.1.4.4.14. Urea Agar Base Concentrado 10x ("Difco")

Composición en g/100ml:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Bacto agar | 1,5 |
| Bacto urea agar base concentrado | 10,0 ml |

Preparación:

Se suspenden 1,5 g de Bacto agar en 90 ml de agua destilada calentándose hasta su disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min y una vez enfriado a 50-55°C, se añaden asépticamente los 10 ml que contiene la ampolla de Bacto urea agar base concentrado. Se dispensa el medio en tubos con 10 ml y se dejan enfriar en posición inclinada con un fondo de 2,5 cm.

III.1.4.5. Medios de cultivo empleados para determinar el efecto de su composición en la producción de actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

III.1.4.5.1. Agua de peptona ("Difco")

Composición en g/l:

| | |
|---------------|------|
| Bacto peptona | 10,0 |
| pH | 7,2 |

Preparación:

Se suspenden 10 g de Bacto peptona en 1.000 ml de agua destilada, calentando la solución hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.5.2. Medio base (MB)

Composición en g/l:

| | |
|--------------------------------|--------|
| Extracto de levadura | 5,00 |
| Dextrosa | 10,00 |
| Citrato amónico | 2,00 |
| Cloruro sódico | 2,00 |
| Fosfato potásico dihidrogenado | 1,00 |
| Fosfato dipotásico | 1,00 |
| Sulfato magnésico | 0,20 |
| Sulfato de manganeso | 0,05 |
| Sulfato ferroso | 0,01 |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| pH | 6,2 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 1.000 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución. A continuación, el medio se deja enfriar y se ajusta el pH con HCl 1N. La esterilización se efectúa

en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.5.3. Medio base suplementado al 1.5% (p/v)

Se añaden 15 g de los suplementos que se indican a continuación, a los ingredientes del MB y se procede a su preparación como se describió en la sección anterior:

- peptona “Difco” (MB-peptona)
- proteosa-peptona “Difco” (MB-proteosa-peptona)
- triptosa “Difco” (MB-triptosa)
- triptona “Difco” (MB-triptona)
- hidrolizado (ácido) de caseínas “Oxoid” (MB-caseína).

III.1.4.5.4. Caldo MRS

Ver sección III.1.4.1.2.

III.1.4.5.5. Caldo BHI

Ver sección III.1.4.2.1.

III.1.4.5.6. Caldo APT (“Difco”)

Composición en g/l:

| | |
|------------------------|--------|
| Triptona | 12,50 |
| Extracto de levadura | 7,50 |
| Dextrosa | 10,00 |
| Citrato sódico | 5,00 |
| Cloruro sódico | 5,00 |
| Fosfato dipotásico | 5,00 |
| Sulfato magnésico | 0,80 |
| Cloruro de manganeso | 0,140 |
| Sulfato ferroso | 0,040 |
| Clorhidrato de tiamina | 0,0001 |
| Monoleato de sorbitán | 0,20 |
| pH | 6,7 |

Preparación:

Se suspenden 46,2 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada, calentando la solución hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.4.5.7. Caldo triptona soja (TSB, “Oxoid”)

Composición en g/l:

| | |
|---------------------------------------|------|
| Digerido pancreático de caseína | 17,0 |
| Digerido papaínico de semilla de soja | 3,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Fosfato dipotásico | 2,5 |
| Glucosa | 2,5 |
| pH | 7,0 |

Preparación:

Se suspenden 30 g del medio deshidratado en 1.000 ml de agua destilada, calentando la solución hasta su disolución. El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

II.1.4.6. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de las bacterias utilizadas en las experiencias genéticas

III.1.4.6.1. Caldo Luria-Bertani (LB)

Composición en g/l:

| | |
|----------------------|------|
| Bacto triptona | 10,0 |
| Extracto de levadura | 5,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| pH | 7,0 |

Preparación:

Se suspenden los componentes en 950 ml de agua destilada, se mantienen en agitación con calor hasta su disolución y, seguidamente, se ajusta el pH con NaOH 1N. Se trasvasa la solución a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.4.6.2. Agar LB con ampicilina (50 µg/ml)

El agar LB al 1% (p/v) se prepara como se ha descrito en la sección anterior, pero añadiendo 1 g de bacto agar. Una vez esterilizado y atemperado el medio a 50-55 °C, se añade 1 ml de una solución de ampicilina ("Sigma") (50 mg/ml) esterilizada con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

III.1.4.6.3. Caldo LB con ampicilina (100 µg/ml)

El caldo se prepara como se describió en la sección III.1.4.6.1 y posteriormente se distribuyó en tubos de 5 ml a los cuales se les añadieron 10 µl de la solución de ampicilina (50mg/ml).

III.1.4.6.4. Caldo SOC

Composición en g/200ml:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Bacto triptona | 4,00 |
| Extracto de levadura | 1,00 |
| Solución de NaCl 1M | 2,00 ml |
| Solución de KCl 1M | 0,50 ml |
| Solución de MgCl ₂ 2M | 2,00 ml |
| Solución de glucosa al 40% | 2,00 ml |
| pH | 7,0 |

Preparación:

Se mezclan los componentes, excepto la solución de glucosa, en 150 ml de agua destilada y se mantienen en agitación hasta su disolución, ajustándose seguidamente el pH con NaOH 1N. Se trasvasa la solución a un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua desionizada, esterilizándola en autoclave a 121°C durante 20 min. Una vez enfriada la solución a 50-55°C, se añaden 2 ml de la solución de glucosa previamente esterilizada con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

III.1.4.6.5. Caldo SOB

Se prepara de forma similar al caldo SOC descrito anteriormente, excepto que la solución de

glucosa se sustituye por 2 ml de una solución de MgSO_4 2M.

III.1.5. SOLUCIONES, TAMPONES Y GELES

Los productos químicos empleados fueron siempre de calidad reactivo y se adquirieron de las firmas “Merck”, “Probus”, “Sigma”, “Fluka”, “Panreac”, “Carlo Erba”, “Serva” y “Bio-Rad”.

III.1.5.1. Tampón de resuspensión de los sobrenadantes libres de células concentrados

Es una solución de fosfato sódico 4 mM, pH 7,0. Para su elaboración se prepararon las siguientes soluciones:

(1) Solución de Na_2HPO_4 4 mM, pH 9,6

Se suspenden 0,56 g de Na_2HPO_4 en 600 ml de agua destilada y se calienta hasta su disolución; se trasvasa a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua destilada.

(2) Solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 mM, pH 4,5

Se suspenden 0,54 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 600 ml de agua destilada y se procede de la manera descrita para la solución (1)

El tampón de fosfato sódico 4 mM, pH 7,0 se prepara añadiendo la solución (2) a la (1), con agitación continua, hasta que se alcanza un pH de 7,0.

III.1.5.2. Soluciones y tampones empleados para la identificación y filiación taxonómica de las bacterias lácticas seleccionadas mediante el análisis de su patrón electroforético de proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

III.1.5.2.1. Tampón salino de fosfato sódico (NaPBS)

| | |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| Contiene: | g/l |
| NaCl | 8,0 |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2M | 40,5 ml |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2M | 9,5 ml |

Preparación:

Se mezclan las 2 soluciones y se disuelve el cloruro sódico; una vez homogeneizada la disolución se trasvasa a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

III.1.5.2.2. Tampón de resuspensión de la muestra (STB)

| | |
|-------------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Tris | 0,75 |
| β -mercaptoetanol | 5,00 ml |
| Glicerol | 10,00 ml |

Preparación:

Se mezclan los componentes y una vez disueltos se trasvasa la mezcla a un matraz aforado de 100 ml, que se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C

durante 15 min.

III.1.5.2.3. Solución de SDS al 20% (p/v)

| | |
|-----------|---------|
| Contiene: | g/100ml |
| SDS | 20,0 |

Preparación:

El SDS se incorpora lentamente a 100 ml de agua desionizada caliente y la solución se mantiene en agitación en una placa calefactora hasta su disolución.

III.1.5.3. Soluciones y tampones empleados durante la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas y su caracterización bioquímica

III.1.5.3.1. Solución de Na_2HPO_4 0,5 M

| | |
|---------------------------|-------|
| Contiene: | g/l |
| Na_2HPO_4 | 70,98 |
| pH | 9,6 |

Preparación:

Se suspende la sal en 600 ml de agua destilada y se calienta hasta lograr su disolución; se trasvasa a un matraz aforado y se enrasa a 1.000 ml con agua destilada.

III.1.5.3.2. Solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M

| | |
|----------------------------------------------------|-------|
| Contiene: | g/l |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 68,89 |
| pH | 4,5 |

Preparación:

Se procede de manera análoga a la descrita para la solución anterior.

III.1.5.3.3. Tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 5,8 (Tampón NaP, pH 5,8)

A partir de la solución de Na_2HPO_4 0,5M se prepara una solución de Na_2HPO_4 10 mM. Para ello se vierten 20 ml de la solución de Na_2HPO_4 0,5M en un matraz aforado de 1 litro y se enrasa con agua desionizada. La solución final tiene un pH aproximado de 9,6.

A partir de la solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5M se prepara una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM. Para ello se procede de igual forma que en el caso anterior. La solución final tiene un pH aproximado de 4,5.

Para preparar el tampón NaP 10 mM, pH 5,8 se añade la solución de Na_2HPO_4 10 mM, pH 9,6 a la solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, pH 4,5 hasta que se alcanza el valor de pH deseado (5,8). Esta solución se denominará en adelante tampón NaP, pH 5,8.

III.1.5.3.4. Solución de NaCl 1M en tampón NaP, pH 5,8

| | |
|-----------|----------|
| Contiene: | g/500 ml |
| NaCl | 29,22 |

Preparación:

Se disuelve la sal en 300 ml de tampón NaP, pH 5,8, se trasvasa la solución a un matraz aforado

de 500 ml y se enrasa con el mismo tampón.

III.1.5.3.5. Solución de sulfato amónico al 10% (p/v) en tampón NaP, pH 5.8

| | |
|-----------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Sulfato amónico | 10,0 |

Preparación:

Se disuelve la sal en 100 ml del tampón NaP, pH 5,8.

III.1.5.3.6. Solución de etanol al 70% (v/v) en tampón NaP, pH 5.8

| | |
|-----------|-----------|
| Contiene: | ml/100 ml |
| Etanol | 30,0 |

Preparación:

Se vierte el alcohol en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con el tampón NaP, pH 5,8.

III.1.5.3.7. Solución de etanol al 40% (v/v)

| | |
|-----------|-----------|
| Contiene: | ml/500 ml |
| Etanol | 200,0 |

Preparación:

Se vierte el alcohol en un matraz aforado de 500 ml y se enrasa con agua destilada.

III.1.5.3.8. Solución de isopropanol al 70% (v/v), pH 2

| | |
|-----------------------|-----------|
| Contiene: | ml/500 ml |
| Isopropanol ("Merck") | 350,0 |

Preparación:

Se vierte el alcohol en un vaso de precipitado y se añaden 100 ml de agua destilada, tras lo cual se ajusta el pH de la solución con HCl12N. Posteriormente se vierte la solución en un matraz aforado de 500 ml y se enrasa con agua destilada.

III.1.5.3.9. Tampón A

| | |
|---------------------------------------|------|
| Contiene: | ml/l |
| Ácido trifluoroacético (ATF, "Merck") | 1,0 |

Preparación:

Se disuelve el ATF en 900 ml de agua desionizada, se trasvasa la solución a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua desionizada. Una vez preparada la solución, se hace pasar a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro, con ayuda de una bomba de vacío.

III.1.5.3.10. Tampón B

| | |
|------------------------|------|
| Contiene: | ml/l |
| Ácido trifluoroacético | 1,0 |

Preparación:

Se procede como se ha descrito para el tampón A, excepto que en este caso el disolvente es 1 l de isopropanol.

III.1.5.3.11. Solución de ditionitrol en caldo MRS ("Difco") (MRS-DTT, 1M)

| | |
|---------------|--------|
| Contiene: | g/5 ml |
| DTT ("Merck") | 0,77 |

Se prepara caldo MRS ("Difco") como se describió en la sección III.1.4.1.3 y, a continuación, se disuelve el agente reductor DTT en 5 ml del medio de cultivo. A partir de la solución resultante (MRS-DTT 1M), se prepararon 100 ml de caldo MRS-DTT 10 mM.

III.1.5.4. Soluciones y tampones empleados para el aislamiento del ADN cromosómico y plasmídico**III.1.5.4.1. Solución de NaCl al 0,9% (p/v)**

| | |
|-----------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| NaCl | 0,9 |

Preparación:

Se disuelve la sal en 100 ml de agua desionizada y, posteriormente, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.2. Solución de Tris-HCl 1M, pH 8

| | |
|-------------------------------|----------|
| Contiene: | g/500 ml |
| Trisma-base anhidro ("Sigma") | 60,55 |

Preparación:

Se disuelve el Trisma-base en 300 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 8,0 con HCl 12N. Seguidamente se enrasa con agua desionizada hasta 500 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.3. Solución de EDTA 0,25 M, pH 8,0

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| Contiene: | g/1000 ml |
| Titriplex III (-2 H ₂ O) (EDTA, "Sigma") | 93,05 |

Preparación:

Se disuelve el EDTA en 600 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 8,0 con NaOH 10N. Se enrasa con agua desionizada hasta 1000 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.4. Tampón STE

Es una solución de sacarosa 7,7% (p/v), Tris Base anhidro 50 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0.

| | |
|-------------------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Sacarosa | 7,7 |
| Tris-HCl 1M, pH 8,0 ("Sigma") | 5,0 ml |
| EDTA 0,25 M, pH 8,0 | 0,4 ml |

Preparación:

Se mezclan los componentes en un vaso de precipitado con un poco de agua desionizada. Se trasvasa la mezcla a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza pasándola a través de filtros de 0,45 µm de diámetro de poro.

III.1.5.4.5. Tampón TED

Es una solución de Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0 y glucosa 50 mM.

| | |
|---------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| Glucosa | 0,99 |
| Tris-HCl 1M, pH 8,0 | 2,50 ml |
| EDTA 0,25M, pH 8,0 | 4,00 ml |

Preparación:

Se mezclan los componentes en un vaso de precipitado con un poco de agua desionizada. Se trasvasa la mezcla a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza a través de filtros de 0,45 µm de diámetro de poro.

III.1.5.4.6. Solución de lisozima (5mg/ml)

Se disuelven 5 mg de lisozima en 1 ml del tampón TED y posteriormente la solución se esteriliza con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro.

III.1.5.4.7. Solución de EDTA 0.5 M. pH 8.0

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Contiene: | g/1000 ml |
| Titriplex III (-2 H ₂ O) | 186,12 |

Para su preparación se procede de manera análoga a la descrita en la sección III.1.5.4.3.

III.1.5.4.8. Tampón ET

Es una solución de Tris-HCl 50 mM y EDTA 250 mM, pH 8,0.

| | |
|---------------------|----------|
| Contiene: | ml/50 ml |
| Tris-HCl 1M, pH 8,0 | 2,5 |
| EDTA 0,5M | 25,0 |

Preparación:

Se mezclan los componentes y una vez disueltos se trasvasa la mezcla a un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.9. Tampón de SDS al 20% (p/v)

Es una solución de SDS al 20% (p/v), Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM, pH 8,0.

| | |
|----------------------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| SDS | 20,0 |
| Tris-HCl, 1M, pH 8,0 | 5,0 ml |
| EDTA 0,25 M pH 8,0 | 8,0 ml |

Preparación:

Se mezclan los componentes y se disuelven con agitación y calor. Una vez enfriada la solución, se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.10. Solución de NaOH 3M

| | |
|-----------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
|-----------|----------|

NaOH

12,0

Preparación:

Esta solución se prepara inmediatamente antes de su empleo. Se disuelve la sal en 80 ml de agua desionizada, se trasvasa la solución a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada.

III.1.5.4.11. Solución de Tris-HCl 2M, pH 7,0

| | |
|---------------------|----------|
| Contiene: | g/250 ml |
| Trisma-base anhidro | 60,55 |

Preparación:

Se disuelve el Trisma-base en agua desionizada y se ajusta el pH a 7,0 con 1 ó 2 gotas de HCl 12N. Seguidamente se enrasa con agua desionizada hasta 250 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.12. Solución de NaCl 5M

| | |
|-----------|----------|
| Contiene: | g/100 ml |
| NaCl | 29,25 |

Para su preparación se procede de la manera descrita en la sección III.1.5.4.10.

III.1.5.4.13. Solución de fenol-Tris (1:1)

Es una solución de fenol redistilado en solución salina (0,9% NaCl). La 8-hidroxiquinolina es un antioxidante que evita la oxidación del fenol, siendo también un débil quelante de iones metálicos y un inhibidor parcial del enzima ARNasa. Esta sustancia proporciona además una coloración amarilla, que facilita la identificación de las fases líquidas separadas.

Contiene:

| | |
|------------------------------|-------|
| Fenol ("Merck") | 1 vol |
| Tris 2M, pH 7,5 | 1 vol |
| 8-Hidroxiquinolina ("Serva") | 0,1% |

Preparación:

El fenol se licua en un baño regulado a 80°C y se añade un 0,1% de hidroxiquinolina para retardar la oxidación del fenol y colorear la solución. Se añade un volumen de Tris 2M, pH 7,5 y se deja con agitación a 4°C hasta la separación de las fases polar y apolar. La fase inferior se elimina por aspiración con una bomba de vacío. A continuación se repite la operación empleando dos volúmenes de agua destilada. Finalmente se retira la fase acuosa (superior) y la solución de fenol-Tris se conserva a -20°C en un envase opaco. Esta solución es muy corrosiva, por lo que debe manipularse siempre con guantes y en una cabina de aspiración de aire.

III.1.5.4.14. Solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)**Contiene:**

| | |
|--------------------|--------|
| Cloroformo | 24 vol |
| Alcohol isoamílico | 1 vol |

Preparación:

Se mezcla cuidadosamente el cloroformo y el alcohol isoamílico, en una cabina de aspiración de

aire, y la solución resultante se conserva a temperatura ambiente.

III.1.5.4.15. Solución de fenol-Tris cloroformo-isoamílico (1:1)

Contiene:

| | |
|-------------------------------|------|
| Fenol-Tris | 1vol |
| Cloroformo-alcohol isoamílico | 1vol |

Preparación:

Se mezclan ambas soluciones en una cabina de aspiración de aire. La solución resultante se conserva a 4°C en un envase opaco, durante un periodo máximo de una semana.

III.1.5.4.16. Tampón TE, pH 7.5

Es una solución de Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7.5.

Contiene: ml/250 ml

| | |
|---------------------|-----|
| Tris-HCl 1M, pH 7,5 | 2,5 |
| EDTA 0,25M, pH 8,0 | 1,0 |

Preparación:

Se mezclan los componentes y se enrasa con agua desionizada en un matraz aforado de 250 ml. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.4.17. Solución de ARNasa (1mg/ml) (Tampón TER)

Se disuelven 100 µl de una solución de ARNasa (10 mg/ml) en 900 µl de tampón TE. La solución resultante se conserva a -20°C.

III.1.5.4.18. Tampón de acetato sódico 3M, pH 7,0

Contiene: g/100 ml

| | |
|----------------|-------|
| Acetato sódico | 24,60 |
|----------------|-------|

Preparación:

Se disuelve la sal en 80 ml de agua desionizada y se ajusta el pH con ácido acético glacial diluido; se trasvasa la solución a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.5. Soluciones, tampones y geles empleados para la visualización del ADN cromosómico y plasmídico

III.1.5.5.1. Solución de EDTA 0.5M, pH 8,0

Ver sección III.1.5.4.7.

III.1.5.5.2. Geles de agarosa

Los geles de agarosa al 0,8 y 2% (p/v) se realizaron con agarosa SeaKem LE y Nu Sieve 3:1, respectivamente, ambas suministradas por "FMC Bioproducts".

III.1.5.5.3. Tampón de Tris-acetato (TAE 50x)

Contiene: g/l

| | |
|-----------------------|----------|
| Tris-base | 242,0 |
| Ácido acético glacial | 57,1 ml |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 100,0 ml |

Preparación:

Se mezclan las dos soluciones y se disuelve el Tris-base; seguidamente se trasvasa la solución a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min. El TAE 50x se mantiene a temperatura ambiente y sirve de solución madre para preparar el tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM).

III.1.5.5.4. Solución de transporte (10x)

Esta solución aumenta la densidad de las muestras, permitiendo que el ADN se introduzca adecuadamente en los pocillos del gel; además, al contener azul de bromofenol permite la visualización del frente electroforético.

| | |
|------------------------------|-----------|
| Contiene: | ml/10 ml |
| Glicerol | 5,00 |
| Agua desionizada | 4,75 |
| Solución TAE (40 x) pH 7,2 | 250,00 µl |
| Azul de bromofenol ("Merck") | 25,00 mg |

Preparación:

Se mezclan los componentes y, una vez disueltos, se alicuota la solución en viales de 1 ml que se mantienen a 4°C ó a -20°C.

III.1.5.5.5. Solución de bromuro de etidio (BrEt) (10 mg/ml)

El bromuro de etidio (BrEt) es un compuesto fluorescente que se intercala entre las bases del ADN y que emite fluorescencia a 590 nm, en la región rojo-naranja del espectro visible. Es un compuesto mutagénico y tóxico, por lo que las soluciones deben manipularse siempre con guantes y tomando las precauciones oportunas.

Se preparó una solución madre de BrEt (10 mg/ml de agua desionizada) que se conservó a temperatura ambiente en un frasco opaco.

III.1.5.6. Tampones empleados para la preparación de células competentes de *E. coli* DH5α**III.1.5.6.1. Tampón TB**

Es una solución PIPES 10mM (Piperazina-N',N'-bis-2-etano sulfónico, "Sigma"), CaCl₂ 15 mM, KCl 250mM, MnCl₂ 55mM.

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Contiene: | g/200 ml |
| PIPES | 0,60 |
| MnCl ₂ ·2H ₂ O | 1,77 |
| KCl | 3,73 |
| Solución de CaCl ₂ 1M | 2,00 ml |
| pH | 6,7 |

Preparación:

Se disuelven todos los componentes en 150 ml de agua desionizada y se ajusta el pH con KOH 1M. La solución se trasvasa a un matraz aforado de 200 ml, se enrasa con agua desionizada y se

esteriliza con filtros de 0,22 μm de diámetro. La solución se conserva a 4°C.

III.1.5.7. Soluciones y tampones empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) fueron suministrados por la casa "Pharmacia" en viales individuales que contenían el dNTP correspondiente a una concentración de 100 mM, pH 7,5.

El MgCl_2 empleado como cofactor en la reacción y el tampón 10x ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ 200 mM, Tris-HCl 750 mM, pH 9,0, Tween 0,1% (p/v) fueron suministrados por la firma "Advanced Biotechnologies LTD".

El aceite mineral utilizado para evitar la desecación de las muestras fue suministrado por "Sigma". El agua desionizada empleada se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

III.1.5.8. Soluciones y tampones empleados para la secuenciación del ADN

III.1.5.8.1. Tampón Binding & Wash (B&W) 2x

Es una solución de NaCl 2M, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7,5.

| Contiene: | ml/100 ml |
|---------------------|-----------|
| Tris-HCl 1M, pH 7,5 | 1,0 |
| EDTA 0,5 M | 0,2 |
| NaCl 5M | 40,0 |

Preparación:

Se mezclan las 3 soluciones y, seguidamente, se trasvasa la solución resultante a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. Esta solución se mantiene a temperatura ambiente y sirve de solución madre para preparar el tampón B&W 1x.

III.1.5.8.2. Solución de NaOH 0,1N

| Contiene: | g/500 ml |
|-----------|----------|
| NaOH | 2,0 |

Preparación:

Se suspenden las lentejas de sosa en 400 ml de agua desionizada. Una vez atemperada la solución se trasvasa a un matraz aforado de 500 ml y se enrasa con agua desionizada.

III.1.5.8.3. Tampón TE, pH 7,5

Ver sección III.1.5.4.16.

III.1.5.8.4. Solución de HCl 1M

| Contiene: | ml/100 ml |
|---------------------------------------------------|-----------|
| HCl comercial (Riqueza: 37%; densidad: 1,199kg/l) | 8,3 |

Preparación:

Se mezcla el HCl con 80 ml de agua desionizada y se trasvasa la solución a un matraz aforado de 100 ml, enrasándose a continuación con agua desionizada. A partir de esta solución se prepararon 50 ml de una solución de HCl 0,2M, la cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante

20 min.

III.1.5.8.5. Solución de Tris-HCl 1M, pH 7,5

Se prepara como se describió en la sección III.1.5.4.2, pero ajustando el pH a 7,5.

III.1.5.8.6. Tampón TBE 10x

| | |
|----------------------|-------|
| Contiene: | g/l |
| Tris-base | 108,0 |
| Ácido bórico | 55,0 |
| Na ₂ EDTA | 9,3 |

Preparación:

Se disuelven los componentes en 600 ml agua destilada. La solución resultante se trasvasa a un matraz aforado de 1.000 ml y se enrasa con agua desionizada.

III.1.5.8.7. Solución de acrilamida bis-acrilamida (40% p/v)

| | |
|------------------------------------------|------|
| Contiene: | g/l |
| Acrilamida ("Bio-Rad") | 38,0 |
| N, N'-metilén-bis acrilamida ("Bio-Rad") | 2,0 |

Preparación:

Se mezclan los componentes en 40 ml de agua desionizada y se disuelven en una placa calefactora. Una vez enfriada la solución se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua desionizada. La solución se conserva en un envase opaco a 4°C durante 1 ó 2 semanas. La acrilamida es una sustancia muy tóxica por lo que siempre que se utilice se deben proteger las manos con guantes y emplear una mascarilla.

III.1.5.8.8. Solución de persulfato amónico (SPA) (25% p/v)

| | |
|--------------------|-------|
| Contiene: | mg/ml |
| Persulfato amónico | 250 |

Preparación:

Se disuelve el persulfato amónico en 1 ml de agua desionizada. La solución se conserva a -20°C.

III.1.5.8.9. Solución de acrilamida (6% v/v) urea (6M)

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Contiene: | ml/100 ml |
| Tampón TBE 10x | 9,0 |
| Acrilamida bis acrilamida (40%) | 13,5 |
| Urea ("Bio-Rad") | 41,4 g |

Preparación:

Se mezclan los componentes con 10 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado y se mantiene en una placa calefactora con agitación suave hasta su disolución. Una vez enfriada la solución, se trasvasa a una probeta de 100 ml y se añade agua desionizada hasta 90 ml. A continuación la solución se hace pasar a través de filtros Whatman n° 1 para eliminar los restos de cristales de urea. La solución debe prepararse justo en el momento de su empleo y conservarse en hielo fundente.

III.1.5.8.10. Solución de N,N,N, N'-tetra-metil-etiléndiamina (TEMED)

Es una solución comercial suministrada por la casa "Bio-Rad". Esta sustancia se adiciona, junto a la SPA, a la solución de acrilamida (6% v/v) con urea (6M) para la preparación de los geles de secuenciación (sección III.2.11.10.6.1).

III.1.5.8.11. Solución de lavado y fijación

Es una solución de ácido acético al 5% (v/v) y metanol al 15% (v/v).

| | |
|------------------|-------|
| Contiene: | ml/l |
| Ácido acético | 50,0 |
| Metanol | 150,0 |
| Agua desionizada | 800,0 |

Esta solución se conserva a temperatura ambiente y se puede reutilizar hasta 5-7 veces.

III.1.6. *KITS* COMERCIALES

Los patrones de fermentación de hidratos de carbono se determinaron mediante un *kit* comercial suministrado por la firma "BioMérieux", que contiene medio Api 50 CHL y galerías Api 50 CH y (sección III.1.4.4.9).

La determinación de la producción del tipo de isómero del ácido láctico (D-ácido láctico/L-ácido láctico) se realizó empleando el *kit* comercial de detección ultravioleta D-Lactic acid/L-Lactic acid, suministrado por la casa "Boehringer Mannheim". Este *kit* contiene una solución de L-ácido glutámico (15 mg/ml) en tampón glicilglicina pH 10,0; una solución de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD) (35 mg/ml) en agua destilada; una solución con el enzima glutamato-piruvato-transaminasa (1.571 U/ml); una solución con el enzima D-lactato deshidrogenasa (5.428 U/ml); una solución con el enzima L-lactato deshidrogenasa (5.428 U/ml) y dos soluciones patrón, una con D-ácido láctico y otra con L-ácido láctico.

La concentración de proteína en las muestras de bacteriocinas purificadas se determinó con un *kit* suministrado por "Pierce-Chemicals" que contenía azul brillante de Coomassie G-250 como reactivo colorimétrico específico de las proteínas y seroalbúmina bovina fracción 5 (SAB) como patrón interno.

El aislamiento y la purificación del fagémido p-Bluescript II SK+ de las células de *E. coli* DH5 α transformado químicamente se realizó empleando el *kit* comercial Wizard Minipreps DNA Purification System, suministrado por "Promega". Este *kit* incluye 50 minicolumnas con sus correspondientes soportes, una solución con la resina de purificación del ADN, el tampón de resuspensión de las células (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, ARNasa (100 mg/ml), la solución de lisis (NaOH 0,2M, 1% SDS), la solución de neutralización (acetato potásico 1,32 M, pH 4,8) y la solución de lavado (200mM NaCl; 20mM Tris-HCL, pH 7,5; 5mM EDTA). Antes de su empleo la solución de lavado se diluye con alcohol etílico al 95% (v/v) hasta una concentración final de alcohol del 55% (v/v).

Los fragmentos de ADN de interés se extrajeron de los geles de agarosa empleando el *kit* comercial QIAEX II Gel Extraction (150) de "Qiagen", que incluye el tampón QX1, con una elevada concentración de sales caotrópicas, el tampón QIAEX II, con partículas de sílica, y el tampón PE concentrado. Antes de su empleo el tampón PE se diluye con alcohol etílico al 95%

(v/v) hasta una concentración final de etanol del 55% (v/v).

La purificación de los productos de PCR se realizó empleando unas minicolumnas con gel de sílica del *kit* comercial QIAquick PCR Purification de “Qiagen”, que incluye también el tampón PE y el tampón PB, con una elevada concentración de sales caotrópicas.

Para la obtención y preparación del ADN de cadena sencilla a partir de los productos PCR purificados, se empleó el *kit* Dynabeads M-280 Streptavidin y un separador magnético, mod. MPC-E-1, ambos suministrados por la firma “Dyna”.

La secuenciación de los ácidos nucleicos se realizó con el *kit* de secuenciación Sequenase Version 2.0 suministrado por “USB”, el cual incluye, además del enzima ADN polimerasa T7 Sequenasa 2.0 y su correspondiente tampón de dilución 8x, los siguientes reactivos: tampón Sequenasa de reacción 5x (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, MgCl₂ 100mM, NaCl 250 mM), solución de ditiotritol (DTT) 0,1M, mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) 5x (7,5 μ M dGTP, 7,5 μ M dCTP y 7,5 μ M dTTP), mezcla de terminación con el didesoxinucleótido ddA (80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dGTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddATP, 50 mM NaCl), mezcla de terminación ddC (80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dGTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddCTP, 50 mM NaCl), mezcla de terminación ddG (80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dGTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddGTP, 50 mM NaCl), mezcla de terminación ddT (80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dGTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddTTP, 50 mM NaCl) y la solución de parada (formamida 95% [v/v], EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% [p/v] y cianol xileno FF 0,05% [p/v]). El desoxinucleótido dATP marcado radiactivamente con el isótopo $\alpha^{35}\text{S}$ fue suministrado por la casa “Amersham Life Science” (“ALS”).

III.1.7. MATERIAL DE LABORATORIO

El agua destilada empleada en este trabajo se obtuvo en un destilador “Afora” y se desmineralizó en un intercambiador “Seta”, mod. R600. Las experiencias cromatográficas, electroforéticas y genéticas se realizaron con agua desionizada ultrapura, libre de pirógenos, obtenida en un aparato “Barnstead”, mod. Nanopure.

El material general de laboratorio constaba de pipetas de Pasteur; pipetas automáticas “Gilson”, mods. P-20, P-200, P-1.000 y “Eppendorf”, mod. 4810; multicanales “Titertek”, mod. 300; pipeteadores automáticos “Bibby”, mod. 3100B; placas calefactoras y agitadoras “Thermolyne”, mod. Nuova II y “Bibby”, mod. B212; agitadores “Heidolph”, mod. Reax 2000 y dispensadores de medios de cultivo “Nichiryo”, mod. 2100DG y “Brand”, mod. Dispensette. El material de vidrio empleado fue del tipo “Pyrex” y el de plástico suministrado por “Nunc”, “Falcon”, “Sterilin” y “Eppendorf”.

Las pesadas ordinarias se efectuaron en balanzas monoplato “AD”, mod. FX-3000 y “Sartorius”, mod. 1474 y las de precisión en balanzas analíticas “AD”, mod. 120A.

Las muestras a centrifugar se equilibraron en una balanza biplato “Cobos”, mod. 201. Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas “Beckmann”, mod. GPR, equipadas con el rotor JA18.1 y “Sorvall”, mods. RC-2 y RC-5B, equipadas con los rotores SS-34 y GSA. Para otras centrifugaciones se empleó una microcentrífuga “Heraeus”, mod. Biofuge 13 y una microcentrífuga refrigerada “Heraeus”, mod. Biofuge 15R, equipadas con un rotor HFA 22.2. Las centrifugaciones instantáneas se llevaron a cabo en centrífugas “Stratagene”, mod.

Picofuge HF-120.

Las liofilizaciones se efectuaron en un aparato "Terruzzi Melvisa", mod. TP-3.

Las muestras se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator", mods. AC-550, "Sanyo", mod. Ultra Low y ACK-55, "Liebherr", mod. GT6102 y "FormaScientific", mod. 86CFreezer; así como en frigoríficos "Kelvinator", mod. AKR20, "Liebherr", mod.38 y "Bosch", mod. Grand cooler.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo y de las soluciones cuya naturaleza así lo permitía se llevaron a cabo en autoclaves "Selecta", mod. Autotester 437-G. Algunas soluciones se esterilizaron por filtración, empleando filtros "Millipore" de 0,22-0,45 μm de diámetro de poro. La esterilización del material de vidrio tuvo lugar por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus", mod. KFTU-K.

Las determinaciones y ajustes de pH se llevaron a cabo en pH-metros "Crison", mod. micropH 2001 y "Metrohm", mod. 654. Las homogeneizaciones se realizaron en un homogeneizador-Stomacher "Colworth", mod. 400.

Las siembras microbianas y los experimentos que requerían condiciones de esterilidad máxima se realizaron en una cámara de flujo laminar "Telstar", mod. CE-A. Las incubaciones se efectuaron en estufas "Heraeus", mods. KB-500, BK-600 y B6200 y en refrigeradores "Velp", mod. 225d, "Sanyo", mod. Medicoool y "Selecta", mod. 247A. Los tratamientos térmicos y enzimáticos, así como las incubaciones que requerían un control más preciso de la temperatura, se efectuaron en baños de agua "Medingen" mod. E o de polietilenglicol 400 provistos de termostatos "Selecta", mods. Unitronic 6320100 y Tectrón.

Las incubaciones que requerían ausencia de oxígeno se realizaron en jarras de anaerobiosis con un generador de gas, suministrados por la firma "Oxoid", mod. Anaerobic system. Las incubaciones que requerían agitación se realizaron en un agitador orbital "Stuar", mod S01.

El crecimiento de los cultivos bacterianos se determinó por turbidimetría, empleando colorímetros "Klett-Summerson", mod. 800-3 y "CIBA-Corning", mod. 252. Los recuentos microbianos se efectuaron en un contador de colonias "WTW", mod. BZG-24. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio "Nikon", mod. L-ke, equipado con lentes de 4x, 10x, 40x y 100x aumentos y con un dispositivo de contraste de fases.

Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron en espectrofotómetros "Hitachi" mod. U-200 y "Schimadzu" mod. UV-160. Las placas microtituladoras de 96 pocillos "Corning" y "Costar", mod. 3590, empleadas en la purificación y determinación de la concentración inhibidora mínima de las bacteriocinas se leyeron espectrofotométricamente en lectores de microplacas "Titertek Multiskan", mod. Plus y "Dynatech", mod. MR-700.

Las cromatografías de filtración en geles se realizaron en columnas de polipropileno, mod. PD-10, preempaquetadas con 9,1 ml de gel Sephadex G-25, suministradas por "Pharmacia-LKB". Las cromatografías de intercambio catiónico e interacción hidrofóbica se realizaron en columnas convencionales mod. Econo Column de la firma "Bio-Rad". En la cromatografía de intercambio catiónico las columnas tenían un tamaño de 2,5 x 30 cm y la matriz cromatográfica empleada fue el gel SP-Sepharose Fast Flow de la casa "Pharmacia-LKB". En la cromatografía de interacción hidrofóbica se utilizaron columnas convencionales de 1,5 x 20 cm y 5,0 x 30 cm y como matrices cromatográficas se emplearon el gel Octyl-Sepharose CL-4B de la casa

“Pharmacia-LKB” y la resina Amberlite XAD-16 de “Supelco”, respectivamente.

Las cromatografías de fase reversa se efectuaron en una columna “Pharmacia-LKB” mod. PepRPC HR5/5 de 5 x 50 mm preempaquetada con 1ml de gel de sílica e integrada en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de la misma firma comercial. El sistema de FPLC constaba de dos bombas de alta presión mod. P-500, un controlador mod. LCC-500Plus, una bomba peristáltica mod. P-1, un *super-loop* de 50 ml de capacidad, un dispositivo de válvulas mod. MV-7, un monitor de luz ultravioleta mod. UV-M-II y un impresora registradora mod. REC-2. Los tampones empleados en la cromatografía FPLC se filtraron por filtros “Millipore”, mod. GS, de 0,22 μm de diámetro de poro, empleando una bomba de vacío “Eyela”, mod. A-3S. Las muestras a cromatografiar se filtraron por filtros “Gelman Sci.”, mod. Acrodisc PF, de 0,22 μm de diámetro de poro. La desecación a vacío de las muestras se efectuó en un rotavapor “Howe”, mod. GV1, acoplado a una bomba de vacío “Edwards”, mod. ED100.

Para la optimización de la producción de bacteriocinas se empleó un fermentador de mesa “B. Braun Biotech International”, mod. Biostat B. El equipo constaba de una unidad computerizada programable para el control de la temperatura, el pH, la presión de oxígeno (pO_2) y la agitación y de un tanque reactor de doble pared de cristal de borosilicato con capacidad para 2-3 litros de cultivo. El tanque disponía de vías para la inoculación del cultivo y la toma de muestras, para la entrada de nitrógeno y para la entrada de NaOH 6M; asimismo, disponía de un sistema de condensación del vapor de agua, un agitador mecánico, un electrodo de pH y otro de pO_2 y un termostato.

Para realizar el análisis del patrón electroforético de las proteínas totales de las bacterias lácticas, los geles de electroforesis se desecaron en un aparato “Bio-Rad”, mod. Slab Dryer 224. El escanograma y la digitalización de los electroforegramas se efectuó con un densitómetro “LKB”, mod. Ultroscan Laser, conectado a un ordenador PC MS-DOS equipado con una tarjeta de conversión digital. Los datos se registraron y se procesaron con un programa informático Gelcompar versión 3.0. La comparación cuantitativa de los patrones electroforéticos y la agrupación en *clusters* se efectuó con el programa Gelcompar versión 2.0.

Para la determinación de la composición aminoacídica de las bacteriocinas, mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se empleó un analizador “Biotronik”, mod. LC5000, conectado a un integrador “Spectra Physics”, mod. SP4100.

La secuencia aminoacídica de las bacteriocinas se determinó con un microsecuenciador automático de fase gaseosa “Applied Biosystems”, mod. 477A, conectado a un analizador de derivados feniltioídantofna-aminoácido “Applied Biosystems”, mod. 120A.

La espectrometría de masas de las bacteriocinas se determinó en un analizador de masas “Perkin-Elmer Sciex”, mod. API III TAGA 6000 E (CIEX).

El hielo fundente se obtuvo en un aparato “Scotsman”, mod. AF-10. La filtración de las soluciones electroforéticas que así lo requerían se efectuó por filtros Whatman nº 1. La electroforesis submarina de los geles de agarosa se efectuó en cubetas “Hoefer”, mods. Max HE99 (25,2 cm de separación de electrodos) y Min HE33 (12 cm de separación de electrodos), empleando como fuente de alimentación un aparato “Hoefer”, mod. PS500XT. Los geles se fotografiaron con una cámara instantánea “Polaroid”, mod. MP-4, acoplada a un transiluminador “Spectroline”, mod. TL-312A. Las películas en blanco y negro empleadas fueron “Polaroid”,

mod. 667 y el filtro utilizado fue Kodak 22-A Wratten para luz ultravioleta.

Las experiencias de amplificación del ADN mediante la técnica de PCR se realizaron en un termociclador de ADN suministrado por la firma comercial "Perkin-Elmer-Cetus".

Para la realización de los geles de secuenciación de ADN se emplearon cristales de 33x42 y de 33x39,4 cm, peines con dientes de cocodrilo y dos separadores laterales de plástico suministrados por "Bethesda Resesarch Laboratories" (BRL). Para evitar la adherencia del gel al cristal pequeño de secuenciación se empleó una solución de silicona, Sigmacote SL-2, suministrada por "Sigma". Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas "BRL", mod. S2, que se conectaron a una fuente de alimentación de alto voltage "Hoefer Scientific Instruments", mod. PS 2500 DC. Los geles se deshidrataron en un desecador horizontal "Hoefer Scientific Instruments", mod. SE 1160. La visualización de las señales radiactivas emitidas por el isótopo S^{35} se llevó a cabo con películas "Kodak", mod. BioMax MR (35x43 cm) incubándose en cartuchos "Kodak", mod. X-Omatic. Las películas se revelaron en un revelador automático "AGFA-Gevaert", mod. Gevomatic 60, utilizándose la solución fijadora G153 B y reveladora G 354, ambas suministradas por la casa "AGFA-Gevaert".

III.2. MÉTODOS

III.2.1. AISLAMIENTO Y PRESELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ELABORADOS ARTESANALMENTE

Para el aislamiento de las bacterias lácticas se tomaron asépticamente 20 g de la porción central de cada embutido crudo curado artesanal (chorizo casero) y se homogeneizaron durante 10 min en 100 ml de medio de mantenimiento (MM). El homogeneizado se incubó a 32°C durante 7 horas, para revitalizar la flora microbiana presente en las muestras. Posteriormente, se prepararon diluciones decimales de las muestras en MM y se sembraron 100 µl en placas de Petri con 20 ml de agar sólido MRS (sección III.1.4.1.2). Tras extender las muestras homogéneamente por la superficie del agar con ayuda de un asa de Driglaski, las placas se cubrieron con 10 ml de agar semisólido MRS fundido para crear condiciones de microaerofilia. Una vez solidificado el medio, se incubaron las placas en posición invertida a 32°C durante 72 horas (salvo que se indique lo contrario, las incubaciones se realizaron siempre estáticamente y en aerobiosis).

Finalizada la incubación se preseleccionaron al azar 96 colonias de cada embutido con las siguientes características: tamaño pequeño (1-2 mm), forma convexa, bordes lisos y color blanco. Las placas que contenían las colonias preseleccionadas se mantuvieron a 4°C hasta su empleo.

III.2.2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

De todas las cepas bacterianas empleadas como microorganismos indicadores y de las bacterias lácticas seleccionadas a lo largo de este trabajo se prepararon tres lotes para su conservación a -20 y -85°C y a 4°C. En todos los casos, los microorganismos se cultivaron previamente durante 16 h bajo las condiciones de incubación indicadas en la Tabla III.1.

III.2.2.1. Conservación en congelación

De cada cultivo se tomaron dos alícuotas de 850 μ l y se les añadieron 150 μ l de glicerol estéril como agente crioprotector. Los cultivos glicerizados se conservaron a -20 y a -85°C. Los cultivos mantenidos a -20°C se emplearon como lote de trabajo, revitalizándose cada dos meses mediante tres transferencias sucesivas en el caldo de cultivo correspondiente.

III.2.2.2. Conservación por liofilización y refrigeración

Alícuotas de 5 ml de los cultivos se centrifugaron a 7.000 rpm y 4°C durante 10 min. El sedimento celular correspondiente se resuspendió en 1,5 ml de medio de leche desnatada y, a continuación, se liofilizó la suspensión bacteriana durante 24-48 h. Los cultivos liofilizados se conservaron indefinidamente a 4°C.

III.2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS

El estudio inicial de la actividad antimicrobiana en medio sólido de las bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados se llevó a cabo mediante el método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura descrito por Fredericq (1948). A continuación y con el objeto de identificar y seleccionar a aquellas cuya actividad antimicrobiana se debía a la producción y liberación de bacteriocinas en medio líquido se empleó una modificación de la prueba de difusión en agar desarrollada por Tagg y McGiven (1971), mediante la que se evaluó la actividad antagonista de los sobrenadantes libres de células neutralizados y esterilizados por filtración, así como de sus correspondientes sobrenadantes concentrados veinte veces por liofilización.

La actividad antimicrobiana se detecta por la aparición de halos de inhibición alrededor de las colonias, en el caso del método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura, o alrededor de los pocillos, en el caso de la prueba de difusión en agar. La actividad antimicrobiana se cuantifica midiendo el diámetro de dichos halos con un calibre.

Los microorganismos indicadores empleados para identificar las bacterias lácticas productoras de actividad antimicrobiana en medio sólido y líquido fueron *P. acidilactici* 347, *Lb. sake* 148, dos bacterias lácticas aisladas previamente en nuestro departamento (Sobrino *et al.*, 1992; Sobrino, 1993; Moreira, 1993), y *Ls. monocytogenes* Scott A.

III.2.3.1. Método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura

Las 96 bacterias lácticas preseleccionadas de cada embutido se sembraron en profundidad, mediante el empleo de palillos estériles, y por cuadruplicado en placas de Petri que contenían agar sólido MRS y se incubaron a 32°C durante 24 horas. Transcurridas 5 horas de incubación, a tres de las cuatro placas se les adicionaron 15 ml del correspondiente agar semisólido fundido (Tabla III.1) conteniendo aproximadamente 1×10^5 ufc/ml del microorganismo indicador. La cuarta placa, a la que no se le adicionó microorganismo indicador, se usó como control. Finalizada la incubación, se seleccionaron aquellas colonias que producían halos de inhibición

nítidos de 4 mm ó más de diámetro frente a uno, al menos, de los tres microorganismos indicadores.

Las colonias seleccionadas se recogieron asépticamente de las placas control con un asa de platino y se incubaron en caldo MRS a 32°C durante 16 horas. Se hicieron tres transferencias consecutivas de las cepas seleccionadas en el mismo medio y se procedió a su conservación como se describió en la sección III.2.2.

III.2.3.2. Método de difusión en agar

Las bacterias lácticas que produjeron los halos de inhibición mayores y más nítidos en medio sólido se analizaron para determinar si producían y liberaban al medio exocelular compuestos antimicrobianos cuando se desarrollaban en caldos de cultivo. Para ello, las bacterias lácticas seleccionadas se desarrollaron en caldo MRS a 32°C durante 16 horas y, posteriormente, se obtuvieron sus sobrenadantes libres de células y sobrenadantes libres de células concentrados veinte veces para evaluar su actividad antimicrobiana.

III.2.3.2.1. Obtención de sobrenadantes libres de células

Los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm y 4°C durante 10 min, se ajustó el pH de los sobrenadantes a 6,2 con NaOH 1M y NaOH 10M y se esterilizaron con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Esta fracción se denominará, en lo sucesivo, sobrenadante.

III.2.3.2.2. Obtención de sobrenadantes libres de células concentrados

Alícuotas de los sobrenadantes se liofilizaron durante 48 horas y se resuspendieron en tampón fosfato sódico 4 mM, pH 7,0 (sección III.1.5.1) hasta un volumen veinte veces menor que el original. Esta fracción se denominará, en adelante, sobrenadante concentrado.

III.2.3.2.3. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de las bacterias lácticas seleccionadas se prepararon placas con agar semisólido (0,75% p/v) conteniendo los microorganismos indicadores a una concentración final de aproximadamente 1×10^5 ufc/ml. Para ello, alícuotas de cultivos de *P. acidilactici* 347, *Lb. sake* 148 y *Ls. monocytogenes* Scott A incubados previamente en caldo MRS o BHI a 32°C durante 16-18 horas, se depositaron en tubos con 20 ml de agar semisólido MRS o BHI fundido y atemperado a 45°C y, después de agitarlos, se depositó su contenido en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio, las placas se secaron en una estufa termostataada a 37°C durante 1 hora. A continuación, con ayuda de un “sacabocados”, se realizaron en las placas pocillos de 6 mm de diámetro en los que se depositaron 50 µl de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados a evaluar. Las placas se preincubaron a 4°C durante 2 horas para favorecer la difusión de las sustancias antimicrobianas y, posteriormente, se incubaron a 32°C durante 24 horas. Finalizada la incubación se cuantificó la actividad antimicrobiana midiendo el diámetro de los halos de inhibición con un calibre.

Las bacterias lácticas cuyos sobrenadantes y/o sobrenadantes concentrados mostraron actividad antimicrobiana mediante esta técnica se seleccionaron para posteriores estudios.

III.2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de las bacterias lácticas seleccionadas se evaluó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2) frente a un total de 26 microorganismos indicadores, que incluían 9 bacterias lácticas, 11 bacterias Gram-positivas, patógenas y/o alterantes de los alimentos, y 6 bacterias Gram-negativas. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación de los microorganismos indicadores se muestran en la Tabla III.1.

III.2.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES

La inmunidad de las bacterias lácticas seleccionadas a su propia actividad antimicrobiana, así como la resistencia o sensibilidad que dichas bacterias lácticas presentaban entre sí y frente a otras bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, aisladas anteriormente en nuestro Departamento, tales como *P. acidilactici* 347 (productor de pediocina PA-1) (Moreira, 1993), *L. lactis* BB24 (productor de nisina A) (Cintas, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995a), *E. faecium* L50 (productor de enterocinas L50A y L50B) (Cintas *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1998b) y *Lb. sake* 148 (productor de lactocina S) (Sobrino, 1993; Cintas *et al.*, 1993), se determinó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2). Para ello se obtuvieron los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de las bacterias lácticas seleccionadas, así como los de las 4 bacterias lácticas citadas anteriormente, y se evaluó su actividad inhibidora empleándose a todos estos microorganismos como indicadores.

III.2.6. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS

III.2.6.1. Morfología y respuesta a la tinción de Gram

La tinción diferencial, descubierta empíricamente por Christian Gram en 1884, permite distinguir las bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas y, asimismo, examinar la morfología y disposición celular características de cada especie bacteriana.

Las bacterias lácticas seleccionadas se incubaron en caldo MRS a 32°C durante 16 horas, tras lo cual se extendieron 2 gotas de los cultivos, con ayuda de un asa de platino, sobre un portaobjetos y se fijó la extensión por calor. Los cultivos fijados se tiñeron sucesivamente con una solución de cristal violeta (1-2 min) y con una solución diluida de yodo (1 min), lavando indirectamente después de cada tinción con agua corriente. Posteriormente, las preparaciones se decoloraron con alcohol etílico y se lavaron con agua corriente. Las muestras se cubrieron con el colorante de contraste (45 segundos) y se lavaron igualmente con agua. Finalmente, las muestras se secaron al aire durante unos minutos y se observaron al microscopio óptico empleando una lente de inmersión de 100x aumentos. Las bacterias Gram-positivas resisten la decoloración y

permanecen teñidas de color azul oscuro-negro mientras que las bacterias Gram-negativas se decoloran y adquieren una tonalidad rosada.

III.2.6.2. Actividad catalásica

Para determinar si las bacterias lácticas seleccionadas producían catalasa, se añadieron 2 gotas de peróxido de hidrógeno (110 vol.) a una gota del cultivo a analizar depositada sobre un portaobjetos. Un resultado positivo se manifiesta por la aparición instantánea de burbujas. Como control positivo se utilizó un cultivo de *Ps. fluorescens*.

III.2.6.3. Crecimiento en presencia/ausencia de oxígeno

Las bacterias lácticas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 32°C durante 16 horas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis estricta. Finalizada la incubación se determinó el crecimiento bacteriano de los cultivos midiendo su absorbancia en unidades Klett.

III.2.6.4. Determinación del pH final de los cultivos

Para determinar si las bacterias seleccionadas acidificaban el medio de cultivo se determinó el pH por inmersión directa de un electrodo de pH en los sobrenadantes libres de células obtenidos de los cultivos desarrollados en caldo MRS a 32°C durante 24 horas.

III.2.6.5. Producción de gas a partir de la glucosa

La cantidad de CO₂ producida a partir de la glucosa por las bacterias lácticas heterofermentativas es muy pequeña, por lo que para determinar su producción se utilizó un procedimiento especial basado en el cultivo de las bacterias lácticas seleccionadas en un medio bien tamponado, con contenido elevado de azúcar y cerrado con un tapón de agar bacteriológico para atrapar el CO₂ formado. Las bacterias lácticas seleccionadas se inocularon en tubos con caldo CS-T modificado y se depositaron 2 ml de agar bacteriológico al 0,75% (p/v) en cada tubo. Una vez solidificados los tapones, se incubaron los tubos a 32°C durante 3 días. La formación de gas se detecta por el desplazamiento hacia arriba de los tapones de agar. Como control positivo se empleó un cultivo de *S. typhi*.

III.2.6.6. Producción de ácido y diacetilo a partir de la glucosa

Las cepas a analizar se sembraron en 10 ml de caldo MR-VP y se incubaron a 32°C durante 2 días. Finalizada la incubación, se tomaron alícuotas de 5 ml de cada cultivo.

Para determinar la producción de ácido (prueba del Rojo de metilo), a una de las alícuotas del cultivo en caldo MR-VP se le añadió 5 gotas de la solución de Rojo de metilo. Una reacción positiva se manifiesta inmediatamente por la aparición de un color rojo debido a la presencia de ácido por la fermentación de la glucosa. Como control positivo se empleó un cultivo de *E. coli*.

Para determinar la producción de diacetilo (prueba de Vogues-Proskauer), se añadieron 5 ml de la solución de hidróxido potásico a los restantes 5 ml de los cultivos en caldo MR-VP. Los tubos se incubaron a 32°C durante 24 horas y se observaron a las 2, 12 y 24 horas. La producción de acetil-metil-carbinol (3-hidroxi-2-butanona) a partir de la glucosa se manifiesta por una coloración rojiza intensa. Este cambio de color se produce al reaccionar el diacetilo

(originado al oxidarse el acetil-metil-carbinol producido) con la peptona del medio en presencia de hidróxido potásico. Como control positivo se empleó un cultivo de *Lb. sake*.

III.2.6.7. Hidrólisis de la arginina

Para determinar si las cepas hidrolizaban la arginina se siguieron dos procedimientos:

1) Las cepas se sembraron en caldo arginina y se incubaron a 32°C durante 2 días. Finalizada la incubación se trasvasó 1 ml de cada cultivo a un tubo de ensayo y se añadió 1 ml de reactivo de Nessler. La hidrólisis de la arginina, con formación de amoníaco como producto final, produce una alcalinización del medio que se manifiesta, tras la adición del reactivo de Nessler, por el desarrollo de una coloración marrón-anaranjada y un precipitado.

2) Las cepas a analizar se sembraron en el medio base de descarboxilasa de Moeller y se incubaron a 32°C durante 3 días. Finalizada la incubación, la hidrólisis de la arginina se manifiesta por la aparición de una coloración violácea en los medios de cultivo.

En ambos casos se empleó un cultivo de *Lb. sake* como control positivo.

III.2.6.8. Producción de ácido sulfhídrico

Las cepas a analizar se sembraron, tanto en picadura como en estría, en tubos con agar de hierro Kligler y se incubaron a 32°C durante 3 días. Finalizada la incubación, la producción de ácido sulfhídrico se manifiesta por un ennegrecimiento del medio de cultivo. Como control positivo se empleó un cultivo de *S. typhi*.

III.2.6.9. Tolerancia a distintas concentraciones de cloruro sódico

La tolerancia de las bacterias lácticas seleccionadas al cloruro sódico se determinó incubándolas en caldo MRS suplementado con un 6,5 y un 10% de cloruro sódico a 32°C durante 72 horas. El desarrollo de los cultivos se determinó a intervalos regulares midiendo su absorbancia en unidades Klett.

III.2.6.10. Tolerancia a distintos valores de pH

La tolerancia al pH de las bacterias lácticas seleccionadas se determinó incubándolas en caldo MRS con el pH ajustado a 4,5 y 5,0 con HCl 1M y 10M y a 9,0 y 9,6 con NaOH 1M y 10 M. Los cultivos se incubaron a 32°C durante 72 horas días, determinándose su desarrollo a intervalos regulares midiendo su absorbancia en unidades Klett.

III.2.6.11. Crecimiento a diversas temperaturas

Las cepas seleccionadas se sembraron en caldo MRS y se incubaron a varias temperaturas durante periodos variables de tiempo: a 8 y 10°C durante 20 días, a 37°C durante 48 horas y a 45 y 50°C durante 24 horas. La evolución del crecimiento de los cultivos se determinó a intervalos regulares, midiendo su absorbancia en unidades Klett.

III.2.6.12. Fermentación de hidratos de carbono

El patrón de fermentación de diversos hidratos de carbono de las bacterias lácticas se determinó mediante el sistema de galerías Api 50 CH. Las cepas se desarrollaron en caldo MRS a

32°C durante 16 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm y 4°C durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en el medio Api 50 CHL. Con ayuda de una pipeta de Pasteur estéril, la suspensión bacteriana se distribuyó en los 50 microtubos de la galería Api 50 CH, cubriéndose la cúpula con unas gotas de agar bacteriológico estéril (1,5% p/v) para crear condiciones de anaerobiosis. Las galerías se incubaron en ambiente húmedo a 32°C, realizándose lecturas de las mismas a las 24, 48 y 72 horas. La fermentación de un sustrato con producción de ácido se manifiesta por un cambio de color del medio del microtubo correspondiente.

III.2.6.13. Pruebas complementarias para las bacterias lácticas del género *Enterococcus*

Las bacterias lácticas identificadas como enterococos empleando las pruebas morfológicas y bioquímicas descritas anteriormente, se sometieron además a algunas de las pruebas selectivas propuestas por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y Devriese *et al.* (1993).

III.2.6.13.1. Crecimiento en presencia de un 0,04% de azida sódica

El caldo EVA descrito en la sección III.1.4.4.10, con azida sódica y violeta etílica como agentes inhibidores, se empleó como medio selectivo para detectar y confirmar la presencia de enterococos. Las bacterias lácticas seleccionadas se inocularon en caldo EVA y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Finalizada la incubación, se determinó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano por turbidometría. Como control positivo se empleó un cultivo de *E. faecalis*.

III.2.6.13.2. Fermentación del manitol en presencia de un 7,5% de cloruro sódico

Los cultivos a analizar se sembraron, mediante la técnica de siembra en superficie por agotamiento, en placas con agar manitol sal. Las placas se incubaron en una estufa termostataada a 37°C durante 72 horas. La fermentación del manitol se detecta por la aparición de halos amarillos alrededor de las colonias. Como control positivo se empleó un cultivo de *E. faecalis*.

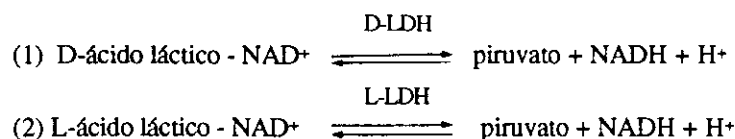
III.2.6.13.3. Tolerancia a las sales biliares

La tolerancia de las bacterias lácticas seleccionadas a las sales biliares se determinó incubándolas en caldo con verde brillante y sales biliares a 32°C durante 72 horas. Finalizada la incubación, se determinó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano por turbidometría. Como control positivo se empleó un cultivo de *E. faecalis*.

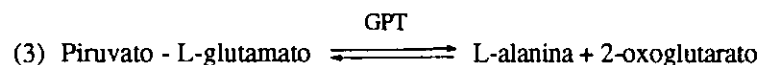
III.2.6.13.4. Determinación del tipo de isómero del ácido láctico (D-ácido láctico/L-ácido láctico)

La determinación de la producción del tipo de isómero del ácido láctico (D-ácido láctico/L-ácido láctico) se realizó empleando el *kit* comercial de detección ultravioleta D-Lactic acid/L-Lactic acid de "Boehringer Mannheim". En presencia del enzima D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), el D-ácido láctico se oxida por acción de la nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD) a piruvato (1). La oxidación del L-ácido láctico, requiere la presencia del enzima L-lactato

deshidrogenasa (L-LDH) (2).



El equilibrio de ambas reacciones se encuentra desplazado hacia la formación del lactato; sin embargo, mediante el enzima glutamato-piruvato-transaminasa (GPT) y en presencia de L-ácido glutámico, es posible desplazar la reacción hacia la formación de piruvato y NADH (3).



La cantidad de NADH formada es estequiométrica a la concentración de D-ácido láctico o de L-ácido láctico, según el enzima utilizado en la reacción, y se detecta espectrofotométricamente a 340 nm.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

- (1) Las bacterias lácticas seleccionadas se inocularon en caldo MRS y se incubaron a 32°C durante 16 horas; posteriormente, alícuotas de los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min y los correspondientes sobrenadantes se mantuvieron en un baño termostático a 80°C durante 15 min.
- (2) A continuación se depositaron 0,10 ml de cada sobrenadante en tubos de ensayo y se añadieron las siguientes soluciones:

| | |
|-------------------------------|---------|
| Solución de L-ácido glutámico | 1,0 ml |
| Suspensión de NAD | 0,20 ml |
| Agua destilada | 0,90 ml |
| Suspensión de GPT | 0,02 ml |

El blanco se preparó de la misma manera pero omitiendo la adición del sobrenadante e incrementando el volumen de agua destilada a 1,0 ml. Tras 5 min se determinó la absorbancia de las muestras y del blanco a 340 nm (A1).

- (3) Seguidamente, se adicionaron 0,02 ml de la solución con el enzima D-LDH y, tras aproximadamente 30 min, se determinó la absorbancia de las muestras y del blanco a 340 nm (A2).
- (4) Finalmente, se adicionaron 0,02 ml de la solución con el enzima L-LDH y, tras aproximadamente 30 min, se determinó la absorbancia de las muestras y del blanco a 340 nm (A3).

A partir de estos resultados se determinó la diferencia entre los valores de absorbancia A2 y A1 correspondientes a la muestra y al blanco. Seguidamente, se sustrajo el valor obtenido con el blanco al correspondiente a la muestra, calculándose de este modo el incremento de absorbancia debido a la producción de D-ácido láctico. De un modo análogo se determinó la diferencia entre los valores de absorbancia A3 y A2 correspondientes al blanco y a la muestra y se calculó el incremento de absorbancia debido a la producción de L-ácido láctico.

III.2.6.13.5. Actividad hemolítica

Los cultivos a analizar se sembraron mediante la técnica de siembra en superficie por agotamiento en placas con Agar sangre. Las placas se incubaron en una estufa termostata a 32°C durante 72 horas. La actividad hemolítica se determinó por la aparición de zonas de lisis en torno a las colonias. Como control positivo se empleó un cultivo de *S. pyogenes*.

III.2.6.13.6. Actividad ureásica

Las cepas a analizar se sembraron, por la técnica de picadura, en tubos con Urea Agar Base Concentrado 10x y, posteriormente, se incubaron a 37°C durante 3 días. La hidrólisis de la urea se manifiesta por la aparición de una tonalidad anaranjada. Como control positivo se empleó un cultivo de *S. pyogenes*.

III.2.7. IDENTIFICACIÓN Y FILIACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SU PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS TOTALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Con objeto de confirmar el género y la especie de las 12 cepas seleccionadas e identificadas en este trabajo, los microorganismos se enviaron al Dr. Bruno Pot del Laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Bioquímica, Fisiología y Microbiología de la Universidad de Gantes, Gantes (Bélgica). Este centro es el laboratorio de referencia para la identificación, clasificación y depósito de las bacterias lácticas de origen alimentario aisladas durante la realización de los proyectos BAM, BRIDGE y BIOTECH, financiados todos ellos por la Comunidad Europea.

A continuación se expone la información de la que se dispone sobre las técnicas empleadas en dicha identificación y filiación taxonómica.

III.2.7.1. Desarrollo de las cepas bacterianas

Tras cultivarse las cepas en caldo MRS a 30°C durante 24 horas, alícuotas de 10 ml de los cultivos se sembraron en frascos Roux con 120 ml de agar MRS (1% p/v) estéril. Tras su incubación a 30°C durante 24 horas, se añadieron 30 ml de tampón NaPBS agitando enérgicamente los frascos y disolviendo los sedimentos celulares con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación, la suspensión bacteriana se pasó por unas gasas de nylon y los filtrados correspondientes se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares obtenidos tras la centrifugación se lavaron dos veces más siguiendo el mismo procedimiento.

III.2.7.2. Obtención de los sobrenadantes libres de células

Aproximadamente 70-80 mg (peso seco) de las células bacterianas se resuspendieron en 0,9 ml de tampón STB y se sonicaron en hielo durante 3 min. A continuación, se añadieron 0,1 ml de solución de SDS al 20%, se agitaron los tubos en un *vortex* y se calentaron a 95°C durante 15 min. Posteriormente, las muestras se sumergieron unos minutos en hielo fundente, tras lo cual se centrifugaron a 10.000 rpm y 4°C durante 10 min, obteniéndose a continuación los correspondientes sobrenadantes libres de células.

Los sobrenadantes se repartieron en dos tubos de Eppendorf, congelándose uno de ellos a -12°C, para su empleo inmediato, y el otro a -80°C, para garantizar su conservación a largo plazo.

III.2.7.3. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras mantenidas a -12°C se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) según la técnica de Laemli (1970).

III.2.7.4. Comparación cuantitativa de los patrones electroforéticos obtenidos

El electroforegrama obtenido se digitalizó por densitometría, registrándose y monitorizándose mediante un programa informático (Vauterin y Vauterin, 1992). Posteriormente, se realizó la comparación cuantitativa de los electroforegramas obtenidos con los de otras bacterias lácticas, según las técnicas descritas por Kersters y De Ley (1975) y Pot *et al.* (1994a). La similitud entre los pares correspondientes se expresó mediante el coeficiente de correlación (*r*) de Pearson y la agrupación en un *cluster* determinado se realizó mediante el método de ligamiento por el término promedio descrito por Sneath y Sokal (1973).

III.2.8. ESPECTRO DE ACCIÓN DE *E. faecium* P13 FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13 se determinó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2), empleando como microorganismos indicadores 22 bacterias lácticas y 22 microorganismos Gram-positivos de interés en la industria alimentaria por su carácter patógeno y/o alterante. Los microorganismos indicadores, así como los medios de cultivo y las condiciones de incubación empleadas se muestran en la Tabla III.1.

III.2.9. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y PARA LA PRODUCCIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

III.2.9.1. Efecto de la composición del medio de cultivo

Para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento y en la producción de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13, se inocularon 1×10^6 ufc de este microorganismo en 10 ml de los medios agua de peptona, MB, MB-peptona, MB-proteosa-peptona, MB-triptosa, MB-triptona, MB-caseína, BHI, APT, TSB y MRS y se incubaron a 32°C durante 16 horas. Finalizada la incubación se determinó el número de microorganismos viables (ufc/ml), mediante recuentos en placa, y el pH final de cada cultivo. Asimismo, se obtuvieron los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de los cultivos y se evaluó su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2), utilizando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. Una vez cuantificado el diámetro de los halos de inhibición se calculó el área de la corona circular de inhibición según la siguiente expresión:

$$\text{área de inhibición} = \frac{\pi}{4} (D^2 - d^2) \times 20$$

donde, D, es el diámetro del halo de inhibición en mm

d, es el diámetro de los pocillos (6 mm)

20, es el factor de conversión para obtener los resultados por ml

El área de la corona de inhibición corresponde a la actividad inhibidora (AI, mm²/ml). A partir de estos valores, teniendo en cuenta el desarrollo bacteriano, se calcularon las actividades inhibidoras específicas (AIE, mm²/log ufc).

III.2.9.2. Efecto de la tensión de oxígeno

Para evaluar el efecto de la tensión de oxígeno en el crecimiento y en la producción de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13, se prepararon cultivos de este microorganismo en caldo MRS y se incubaron a 32°C en aerobiosis y anaerobiosis estricta durante 16 horas. Finalizada la incubación, se determinó el crecimiento bacteriano de los cultivos por espectrofotometría, así como la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes correspondientes, mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2.), empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. Los resultados de la actividad antimicrobiana se expresaron en forma de actividad inhibidora (AI, mm²/ml), a partir de la expresión descrita en la sección anterior, y de actividad inhibidora específica (AIE, mm²/unidades de absorbancia).

III.2.9.3. Efecto de la temperatura

A partir de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C durante 16 horas, se inocularon aproximadamente 1×10^6 ufc en 10 ml de caldo MRS. Para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de su actividad antimicrobiana, los tubos recién inoculados se incubaron a 4 y 8°C durante 20 días, a 16°C durante 72 horas, a 24, 32 y 37°C durante 48 horas y a 45°C durante 24 horas.

III.2.9.3.1. Cinética del crecimiento y de la producción de actividad antimicrobiana

A intervalos de tiempo regulares en función de la temperatura de incubación, se determinó, mediante recuentos en placa, el número de microorganismos viables (ufc/ml) para establecer la cinética de crecimiento de *E. faecium* P13, realizándose además lecturas del pH de los cultivos. Paralelamente, se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes de los cultivos para determinar su actividad inhibidora (AI, mm²/ml) y su actividad inhibidora específica (AIE, mm²/log ufc), como se describió en la sección III.2.9.1, empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. En unos ejes cartesianos se representó log ufc/ml, pH y AI en función del tiempo (abscisas) y se obtuvieron las correspondientes gráficas de crecimiento, pH y producción de actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 a 4, 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C.

III.2.9.3.2. Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano

Los parámetros cinéticos del desarrollo microbiano se determinaron a partir de los datos

obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial de *E. faecium* P13 a cada temperatura.

III.2.9.3.2.1. Velocidad específica de crecimiento (μ)

Un cultivo microbiano en crecimiento equilibrado imita una reacción autocatalítica de primer orden; es decir, la velocidad de aumento del número de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo. La velocidad de crecimiento (μ) se define como el aumento de la masa celular de un cultivo respecto del tiempo, lo que en términos matemáticos se representa como:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N;$$

siendo, N, las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml)

t, el tiempo de incubación

μ , la velocidad específica de crecimiento

Mediante la integración de esta ecuación se obtiene:

$$\text{Ln } N - \text{Ln } N_0 = \mu (t - t_0);$$

y, al convertir los logaritmos neperianos en decimales,

$$\text{Log } N - \text{Log } N_0 = \frac{\mu}{2,303} (t - t_0);$$

Por lo tanto, si tras efectuar los recuentos de ufc/ml a distintos tiempos se representa gráficamente el log ufc/ml frente al tiempo, se obtiene la ecuación de la recta de regresión en la que " μ " es la pendiente de dicha recta multiplicada por 2,303.

III.2.9.3.2.2. Tiempo de duplicación (t_d)

El tiempo de duplicación, t_d , llamado también tiempo de generación, se define como el tiempo requerido para que la masa celular del cultivo aumente en un factor de dos a una temperatura determinada. La relación entre μ y t_d puede deducirse de la expresión:

$$\text{Log } N - \text{Log } N_0 = \frac{\mu}{2,303} (t - t_0)$$

dado que si el intervalo de tiempo considerado ($t - t_0$) es igual al t_d , entonces N equivaldrá al doble de N_0 . Haciendo sustituciones:

$$\text{Ln } \frac{N}{N_0} = \mu t; \quad \text{cuando } N = 2 N_0 \quad \text{Ln } \frac{2 N_0}{N_0} = \mu t_d; \quad \text{Ln } 2 = \mu t_d;$$

$$\text{por lo que,} \quad t_d = \frac{0,693}{\mu}$$

III.2.9.3.2.3. Número de generaciones por hora (g/h)

Otro parámetro importante en la cinética de crecimiento microbiano es el número de

generaciones por hora a una temperatura de incubación determinada. Su valor matemático se corresponde con el recíproco del tiempo de duplicación, t_d , y por lo tanto:

$$g/h = \frac{1}{t_d}$$

III.2.10. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIOCINAS DE *E. faecium* P13 Y *E. faecium* T136

III.2.10.1. Estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 parcialmente purificada

La estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana de *E. faecium* P13 se determinó empleando sobrenadantes o sobrenadantes concentrados obtenidos de cultivos de *E. faecium* P13 desarrollados en caldo MRS a 32°C durante 16 horas.

III.2.10.1.1. Efecto de diversos enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos

La sensibilidad de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 a diversos enzimas se realizó tratando el correspondiente sobrenadante con enzimas proteolíticos (tripsina, papaína, pepsina, proteasa II, proteasa VI y proteasa XIV), glucolíticos (α -amilasa) y lipolíticos (lipasa I y lipasa VII) a concentraciones de 1 y 5 mg/ml. Paralelamente, se prepararon controles consistentes en tubos con caldo MRS a los que se añadieron los enzimas a las mismas concentraciones y en un tubo con sobrenadante al que no se adicionó ningún enzima. Los tubos problema y control se incubaron en un baño a 37°C durante 6 horas con agitación constante, tras lo cual se calentaron a 100°C durante 10 min para, en su caso, inactivar los enzimas e inmediatamente se sumergieron en un baño de hielo fundente. La actividad antimicrobiana de las muestras problema y control se determinó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2) empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136.

III.2.10.1.2. Efecto combinado del pH y de la temperatura

El efecto combinado del pH y de la temperatura en la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinó empleando alícuotas de sobrenadante cuyo pH se había ajustado a valores desde 2,0 a 11,0, con soluciones estériles de HCl y de NaOH de distintas normalidades. Paralelamente, se prepararon tubos control consistentes en caldo MRS con el pH ajustado a los mismos valores. Todas las muestras se esterilizaron haciéndolas pasar a través de filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro. A continuación, los tubos se incubaron en un baño termostático a 25°C y en una cámara de refrigeración a 4°C durante 24 horas. Finalizadas las incubaciones se determinó la actividad inhibidora (AI, mm²/ml) de los sobrenadantes mediante el método de difusión en agar, empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. A partir de la actividad inhibidora se calculó la actividad inhibidora residual (AIR, %) que se define como el porcentaje que la actividad antimicrobiana a un determinado pH y a una determinada temperatura representa frente al valor máximo de actividad antimicrobiana obtenido durante el ensayo.

III.2.10.1.3. Termorresistencia a pH ácido y neutro

La estabilidad térmica de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se evaluó empleando sobrenadantes concentrados con su pH ajustado a valores de 4,5 y 7,0 y obtenidos del siguiente modo: a partir de un sobrenadante de *E. faecium* P13 se prepararon dos alícuotas que se liofilizaron durante 48 h y, a continuación, los extractos secos se resuspendieron en los tampones fosfato sódico 4 mM pH 4,5 y fosfato sódico 4mM pH 7,0, hasta un volumen veinte veces menor que el original. Las muestras se distribuyeron en alícuotas de 0,2 ml en viales de vidrio (10 x 30 mm) que, tras cerrarse herméticamente, se calentaron durante periodos de tiempo variables en un baño de polietilenglicol 400 termostatado a 80, 100, 121, 135 y 150°C. Como control se emplearon alícuotas de las muestras que se mantuvieron sumergidas en un baño de hielo fundente.

III.2.10.1.3.1. Cinética de termodestrucción de la actividad antimicrobiana exocelular

Finalizado el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo fundente, y se determinó su actividad inhibidora (AI, mm²/ml) y la de los controles, mediante la técnica de difusión en agar, empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. A partir de la actividad inhibidora se calculó la actividad inhibidora residual (AIR, %), definiéndose ésta como el porcentaje que la actividad antimicrobiana a un determinado pH y a una determinada temperatura representa frente al máximo valor de actividad antimicrobiana detectada en los controles. Posteriormente, se construyeron las gráficas de termodestrucción representando la actividad inhibidora residual en función del tiempo de calentamiento.

III.2.10.1.3.2. Parámetros cinéticos de termodestrucción

A partir de las gráficas de termodestrucción se calcularon asumiendo una cinética de primer orden los parámetros cinéticos de la inactivación térmica de la actividad antimicrobiana.

III.2.10.1.3.2.1. Tiempo de reducción decimal o valor "D"

El valor "D" se define como el tiempo necesario para disminuir en un 90% la actividad antimicrobiana inicial de los sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13 a una temperatura determinada y se corresponde con el tiempo en que la curva de supervivencia atraviesa un ciclo logarítmico. Su valor numérico se determina a partir de la ecuación de la recta de regresión de la gráfica de termodestrucción en la que se representa el logaritmo de la actividad inhibidora residual en función del tiempo de calentamiento.

La ecuación de esta recta es:

$$\log x = -kt + C$$

siendo, x, la actividad antimicrobiana residual

k, la constante de inactivación en min⁻¹

t, el tiempo de calentamiento de las muestras

Asimismo,

$$\log x_2 - \log x_1 = -k (t_2 - t_1)$$

$$k = \frac{\log x_1 - \log x_2}{t_2 - t_1}; \quad \frac{1}{D} = \frac{\log x_1 - \log x_2}{t_2 - t_1};$$

$$D = \frac{t_2 - t_1}{\log x_1 - \log x_2}$$

Matemáticamente, “D” coincide con el inverso de la pendiente de la recta de regresión.

III.2.10.1.3.2.2. Tiempo medio ($t_{1/2}$)

El tiempo medio, $t_{1/2}$, se define como el tiempo requerido para que la actividad antimicrobiana inicial se reduzca en un 50% a una temperatura determinada. Este parámetro puede determinarse gráficamente, representando el logaritmo de la actividad antimicrobiana residual en función del tiempo de calentamiento, o matemáticamente, asumiendo que el cambio de la actividad antimicrobiana con respecto al tiempo es función de la actividad antimicrobiana inicial (ecuaciones 1 y 2):

$$-\frac{dx}{dt} = kx \quad (1) \quad \text{y} \quad -\frac{dx}{x} = k dt \quad (2);$$

donde, x, representa la actividad antimicrobiana

t, es el tiempo de calentamiento a una temperatura determinada

k, es la constante de inactivación de la actividad antimicrobiana en min^{-1} .

Integrando la ecuación 2 entre dos valores de “x” diferentes (x_0 y x_1) a (t_0 y t_1), y siendo “ x_0 ” la actividad antimicrobiana inicial en el tiempo t_0 , se obtiene:

$$-\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = k \int_{t_0}^t dt; \quad \ln \frac{x_0}{x} = k(t - t_0)$$

por lo que

$$2,3 \log \frac{x_0}{x} = k(t - t_0);$$

$$\text{si } x = 50, \quad 2,3 \log \frac{100}{50} = k t_{1/2}; \quad t_{1/2} = \frac{2,3 \log 2}{k};$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k};$$

donde “k”, coincide con la pendiente de la recta de regresión.

III.2.10.1.3.2.3. Valor “Z”

El valor “Z” se define como la temperatura en °C requerida para disminuir el valor “D” en un 90 % y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión obtenida al representar gráficamente el logaritmo de los valores “D” en función de la temperatura de calentamiento a la que se obtuvieron.

La ecuación de esta gráfica es:

$$\log D = aT + C;$$

donde, D , es el tiempo de reducción decimal a una determinada temperatura

T , es la temperatura del tratamiento térmico en $^{\circ}\text{C}$

Por definición, $a = -\frac{1}{z}$; por lo que $\log D = -\frac{1}{z} T + C$,

$$\log D_2 - \log D_1 = -\frac{1}{z} (T_2 - T_1), \quad \log D_2 - \log D_1 = \frac{1}{z} (T_1 - T_2)$$

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

Matemáticamente, “ Z ”, coincide con el inverso de la pendiente de la recta de regresión.

III.2.10.1.4. Efecto del almacenamiento a distintas temperaturas y pHs

El efecto del almacenamiento en la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinó empleando alícuotas de sobrenadantes cuyo pH se había ajustado a valores de 4,5 y 7,0 empleando soluciones estériles de HCl y NaOH de distintas normalidades. Las muestras se esterilizaron con filtros de 0,22 μm de diámetro de poro y se almacenaron a -20°C , durante 12 meses, y a 4, 8 y 25°C durante 3 meses. La actividad inhibidora (AI, mm^2/ml) se determinó al final del periodo de almacenamiento mediante la técnica de difusión en agar, empleando *E. faecium* T136 como microorganismo indicador. En este caso, la actividad inhibidora residual (AIR, %) se definió como el porcentaje que la actividad inhibidora obtenida tras el almacenamiento a cada temperatura representó frente al valor de actividad antimicrobiana detectado en el sobrenadante antes del almacenamiento.

III.2.10.2. Determinación del modo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 parcialmente purificada frente a *Ls. monocytogenes* ScottA

Con el objeto de elucidar si la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 tenía acción bactericida o bacteriostática se realizó un experimento similar al descrito por Schillinger y Lücke (1989), empleando como microorganismo indicador *Ls. monocytogenes* Scott A. El microorganismo indicador se sembró en caldo BHI y se incubó a 32°C durante 16 horas. A partir de este cultivo se inocularon aproximadamente 2×10^6 ufc en tubos que contenían 4,5 y 4,0 ml de caldo BHI y se añadieron 0,5 y 1 ml del sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13, respectivamente. Como control se realizó un experimento similar, añadiéndose al tubo con el microorganismo indicador 1 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *P. acidilactici* 144, un microorganismo que no mostraba actividad antimicrobiana detectable frente a *Ls. monocytogenes* Scott A. Los tubos problema y control se incubaron a 32°C durante 10 horas, realizándose periódicamente el recuento de las unidades formadoras de colonias en placas de agar

BHI.

El modo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se consideraría bactericida si se observase una disminución en la viabilidad de los microorganismos indicadores, es decir, una disminución de las ufc/ml con respecto al recuento inicial; por otra parte, si los recuentos se mantuviesen constantes durante su incubación significaría que esta bacteriocina ejerce un modo de acción bacteriostático.

III.2.10.3. Purificación a homogeneidad de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136

Las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 se purificaron a partir de un litro de cultivo en fase estacionaria empleando una modificación de los procedimientos descritos por Nissen-Meyer *et al.* (1992) y Havarstein *et al.* (1994). Ambos procedimientos se basan en el empleo de técnicas cromatográficas que permiten separar las diversas fracciones proteicas en base a sus diferentes características físico-químicas.

III.2.10.3.1. Fundamento del proceso de purificación

III.2.10.3.1.1. Precipitación con sulfato amónico

Las proteínas son moléculas anfipáticas que en disolución se encuentran solvatadas por moléculas de agua, exponiendo hacia el exterior (fase acuosa) sus porciones hidrófilas y permaneciendo los grupos hidrófobos en el interior. El sulfato amónico a concentraciones bajas (poca fuerza iónica) aumenta la solubilidad de las proteínas (solubilización por salado); sin embargo, cuando se añaden a altas concentraciones (elevada fuerza iónica) se consigue la precipitación por salado de las mismas. Las moléculas de sulfato amónico, entre otras acciones, disminuyen la solvatación (hidratación) de las proteínas, al competir exitosamente por las moléculas de agua, por lo que aquéllas exponen sus grupos hidrófobos, que interaccionan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals, lo que provoca su precipitación.

III.2.10.3.1.2. Cromatografía de filtración en geles

La cromatografía de filtración en geles permite separar moléculas en disolución de acuerdo con su tamaño molecular. El gel Sephadex G-25 empleado como matriz cromatográfica es un polímero resultante de la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de dextrano y las de epiclorigidrina. Este polímero es muy hidrofílico debido a su gran número de grupos hidroxilo, por lo que aumenta de volumen en presencia de agua o de soluciones electrolíticas. El gel hidratado está formado por un sistema de microesferas de Sephadex con un gran número de poros de diámetro comparable al de las moléculas que se pretende separar; así, pues, las moléculas relativamente pequeñas, como las de sulfato amónico, difunden por las esferas del gel y quedan retenidas; sin embargo, las moléculas mayores -por encima del límite de exclusión-, como las bacteriocinas, no difunden por las esferas y, consecuentemente, abandonan rápidamente el gel. El gel de Sephadex G-25 permite separar polipéptidos con un tamaño molecular entre 1×10^3 y 5×10^3 Da y es activo en un rango de pH entre 2,0 y 13,0.

III.2.10.3.1.3. Cromatografía de intercambio catiónico

La cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico) permite separar moléculas en disolución de acuerdo a su carga eléctrica superficial por lo que su eficacia depende del pH del sistema y del punto isoeléctrico (pI) de las biomoléculas. Cuando el pH de los tampones supera el pI de la biomolécula se emplea un intercambiador aniónico; cuando el pH del sistema es inferior al pI de la biomolécula se utiliza un intercambiador catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico se basa en la adsorción selectiva y reversible de las moléculas con carga neta positiva a una matriz cromatográfica de carga eléctrica neta negativa. En nuestro trabajo, se empleó el gel SP-Sepharose Fast Flow, que es un intercambiador catiónico fuerte, activo en un rango de pH entre 4,0 y 13,0 y que permite separar moléculas de hasta 4×10^6 Da (límite de exclusión). La sefarosa es un gel formado por microesferas de agarosa (6% p/v), de la que se han suprimido los polisacáridos cargados eléctricamente, por lo que se obtiene un gel que carece prácticamente de grupos residuales cargados. A la sefarosa se ligan covalentemente un gran número de radicales sulfopropilo (-SP) de carga negativa. Los grupos cargados se encuentran asociados a cationes “móviles” (Na^+), suministrados por el tampón de equilibrado, que serán reversiblemente reemplazados por iones del mismo signo de las proteínas, sin alterar la conformación de la matriz cromatográfica. Las proteínas permanecen retenidas electrostáticamente en el lecho cromatográfico hasta que se aumenta la fuerza iónica (se introduce un gran número de cargas positivas que compiten por los radicales -SP) y/o se varía el pH del sistema hacia o sobre el pI de la proteína.

III.2.10.3.1.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La interacción hidrofóbica es un tipo de cromatografía de reparto que permite separar los componentes no polares de una solución polar y que se basa en el establecimiento de fuerzas de Van der Waals entre los ligandos de la matriz cromatográfica (gel o resina) y las proteínas en disolución (Srinivasan y Ruckenstein, 1980). Las proteínas hidrófobas quedan retenidas en la matriz debido al establecimiento de fuerzas de atracción de Van der Waals entre sus grupos hidrófobos y los ligandos inmovilizados del gel o resina. Los ligandos y los grupos hidrófobos de los solutos se encuentran rodeados, a modo de “escudo de protección”, por moléculas de agua altamente ordenadas. Las sales disueltas, en el tampón de equilibrado y en la muestra, interaccionan fuertemente con las moléculas de agua, por lo que disminuye su cantidad disponible para formar el “escudo de protección”, favoreciéndose así las atracciones de Van der Waals. Debido a la adición de las sales, las moléculas de agua se desordenan más (aumenta la entropía, ΔS) y, por tanto, se obtiene un valor negativo del incremento de energía libre de Gibbs (ΔG) del sistema, lo que hace que la interacción proteína-ligando sea un proceso termodinámicamente favorable (Hjertén, 1977). Además de las sales, el pH, la temperatura y determinados aditivos ejercen un importante papel en la interacción hidrofóbica. De modo general, valores de pH alejados del pI de las proteínas debilitan las interacciones hidrofóbicas, como resultado de un aumento del número de grupos cargados eléctricamente y del consiguiente aumento de la hidrofiliidad de las proteínas (Hjertén, 1973; Porath *et al.*, 1973). Por otra parte, un aumento de la temperatura favorece termodinámicamente la interacción hidrofóbica (Hjertén, 1976); además, las fuerzas de Van der Waals también aumentan al hacerlo la temperatura

(Parsegian y Ninham, 1970). Por otra parte, concentraciones bajas de alcoholes miscibles en agua y detergentes originan un debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas entre los ligandos y las proteínas, lo que conlleva la elución de los solutos; esto se debe a que los grupos apolares de aquéllos compiten eficazmente por los sitios de adsorción de la matriz cromatográfica, desplazando de ésta a las proteínas ligadas previamente. Lo descrito permite una gran flexibilidad en los diseños experimentales y convierte, por tanto, a la cromatografía de interacción hidrofóbica en un sistema de gran versatilidad. En este trabajo se emplearon dos tipos diferentes de matriz cromatográfica:

1. Resina de Amberlite XAD-16

La resina cromatográfica está constituida por unas mini esferas de polímeros poliaromáticos de naturaleza hidrófoba a los cuales se adsorben muy eficazmente compuestos orgánicos apolares de bajo peso molecular. Las interacciones se establecen entre la superficie de la resina y las regiones hidrófobas de las moléculas a separar.

2. Gel Octyl-Sepharose CL4B

La matriz cromatográfica está constituida por un gel de sefaroza con un 4% (p/v) de agarosa, al que se le añade 2,3- dibromopropanol para establecer enlaces covalentes cruzados que, sin variar la porosidad, confieren a la matriz una mayor estabilidad térmica y física. A la matriz de agarosa se ligan covalentemente, mediante enlaces éter, un gran número de grupos hidrocarbonados hidrófobos de 8 átomos de carbono (ligandos octilo), con la consiguiente obtención del gel Octyl-Sepharose CL4B, que no presenta grupos cargados eléctricamente y que permite el fraccionamiento de moléculas de hasta 2×10^7 Da, siendo activo en un rango de pH entre 3,0 y 13,0.

III.2.10.3.1.5. Cromatografía de fase reversa

La cromatografía de fase reversa (CFR) se basa en el mismo principio que la cromatografía de interacción hidrofóbica, si bien, en este caso el gel cromatográfico está formado por una matriz de sílica que posee un gran número de grupos alquilo, C_2 y C_{18} , ligados covalentemente. Debido al mayor número de ligandos presentes en las columnas de CFR, la adsorción de las proteínas es mucho más fuerte que en los casos anteriores, siendo necesario emplear para su elución solventes no polares. La matriz está formada por partículas de 100Å y permite la separación de biomoléculas de hasta 6×10^3 Da, permaneciendo activo el gel en un rango de pH entre 2,0 y 8,0. La columna empleada, PepRPC HR5/5, se integra en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), lo que permite controlar de forma muy precisa los gradientes de los tampones y lograr así un gran poder de resolución de las proteínas, permitiendo la separación de fracciones hidrofóbicamente muy similares.

III.2.10.3.2. Protocolo de purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13

El proceso de purificación se realizó a temperatura ambiente salvo que se indique lo

contrario. Alícuotas de las fracciones obtenidas durante la purificación se conservaron a 4°C para determinar su absorbancia a 280, 254 y 214 nm y su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4). El procedimiento empleado se describe a continuación:

- 1) A partir de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C durante 16 horas (10^9 ufc/ml, aproximadamente) se inocularon 50 μ l (0,005% v/v) en un frasco que contenía 1 litro de caldo MRS ("Oxoid") y se incubó hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de su desarrollo (A_{620} aproximada de 0,8).
- 2) El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm y a 4°C durante 30 min para obtener el sobrenadante libre de células (fracción I).
- 3) Se añadieron 500 g de sulfato amónico por litro de sobrenadante, a temperatura ambiente y con agitación, y, posteriormente, la muestra se mantuvo a 4°C y con agitación durante 30 min. A continuación se centrifugó a 12.000 rpm y 4°C durante 30 minutos y el precipitado y el material flotante obtenidos se resuspendieron en 120 ml del tampón NaP, pH 5,8 (fracción II).
- 4) La fracción II se desaló por cromatografía de filtración en geles como paso previo a la cromatografía de intercambio catiónico. Las 20 minicolumnas empleadas para cada muestra se lavaron con abundante agua desionizada, para eliminar la solución en la que se mantenían conservadas, se equilibraron con 10 ml de tampón NaP, pH 5,8 y en cada una de ellas se depositaron 2 ml de la muestra. Una vez embebidas las muestras en el lecho cromatográfico, se añadieron 4 ml de agua desionizada. Las fracciones de 4 ml "eluidas" de las minicolumnas se mezclaron y juntas constituyeron la correspondiente fracción III (230 ml, aproximadamente). Las sales retenidas en las minicolumnas se eliminaron añadiendo a cada una de ellas 5 ml de agua desionizada.
- 5) Para realizar la cromatografía de intercambio catiónico se depositaron aproximadamente 15 ml del gel SP-Sepharose Fast Flow en la columna cromatográfica correspondiente y, a continuación, se lavó el gel con abundante agua desionizada para eliminar la fase acuosa en la que se mantenía conservado. Seguidamente, la matriz cromatográfica se equilibró con 50 ml de tampón NaP, pH 5,8 y se depositó lentamente la fracción III, mediante el empleo de una pipeta de Pasteur. La fracción que abandonaba la columna se recogió y se mantuvo a 4°C hasta su empleo. Posteriormente, la columna se lavó con 50 ml del tampón NaP, pH 5,8. La elución de los compuestos retenidos electrostáticamente en la columna se realizó aumentando la fuerza iónica; para ello se añadieron a la columna 50 ml de una solución 1 M de NaCl en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción IV.
- 6) Para efectuar la cromatografía de interacción hidrofóbica se depositaron aproximadamente 2 ml del gel Octyl-Sepharose CL4B en la columna cromatográfica correspondiente y se lavaron con abundante agua desionizada y, seguidamente, con isopropanol. Una vez empaquetado el gel, éste se equilibró con 15 ml de una solución de sulfato amónico al 10 % (p/v) en tampón NaP, pH 5,8. A la muestra a cromatografiar (fracción IV) se le añadió también sulfato amónico, hasta una concentración final de un 10 % (p/v), tras lo que se depositó lentamente en la columna. La fracción que abandonaba la matriz cromatográfica se recogió y se mantuvo a 4°C hasta su empleo. Seguidamente la columna se lavó con 15 ml del tampón de

equilibrado y las sustancias hidrófobas retenidas se eluyeron con 10 ml de una solución de alcohol etílico al 70% (v/v) en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción V.

- 7) A la muestra a cromatografiar (fracción V) se le añadió ácido trifluoroacético, a una concentración final del 0,1% (v/v), y se hizo pasar a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro. Posteriormente, la muestra se diluyó con tampón A (0,1% ATF en agua desionizada) hasta un volumen de 50 ml y se cargó con una bomba peristáltica en el *super-loop* de 50 ml del equipo de cromatografía FPLC. La columna de fase reversa PepRPC HR5/5 se colocó en el equipo de FPLC y se equilibró con el tampón A, tras lo que la muestra a cromatografiar se inyectó automáticamente a un flujo de 1 ml/minuto. La columna se lavó con tampón A hasta que la A_{254} alcanzó de nuevo la línea basal y la muestra se eluyó a un flujo de 0,5 ml/minuto con un gradiente lineal de 0 a 100 de tampón B (0,1% ATF en isopropanol) en tampón A registrándose automáticamente la A_{254} de las fracciones eluidas. A continuación, se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, y aquellas que la manifestaban se mezclaron y se diluyeron hasta 10 ml con tampón A, recromatografiándose nuevamente, bajo condiciones similares a las descritas, hasta que se obtuvo un único pico de absorbancia con actividad antimicrobiana. A las fracciones cromatográficas finales se les añadió isopropanol, a una concentración final del 50-60% (v/v) y se conservaron a -20°C hasta su empleo posterior.

III.2.10.3.3. Protocolo de purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136

El protocolo de purificación empleado fue similar al descrito en la sección anterior, con las siguientes modificaciones:

- 1) A partir de un cultivo de *E. faecium* T136 desarrollado en caldo MRS ("Oxoid") a 32°C durante 16 horas (10^9 ufc/ml, aproximadamente) se inocularon 50 μl (0,01% v/v) en dos frascos que contenían 0,5 litros de caldo MRS.
- 2) El precipitado y el material flotante, obtenidos tras precipitar las proteínas del sobrenadante libre de células (Fracción I) con sulfato amónico, se resuspendieron en 200 ml del tampón NaP, pH 5,8 (fracción II).
- 3) Se omitió la cromatografía de filtración en geles, por lo que la fracción II se aplicó directamente a la columna cromatográfica de intercambio catiónico.

III.2.10.3.4. Detección y cuantificación de la actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136, así como de las fracciones obtenidas durante la purificación de las sustancias antimicrobianas, se determinó empleando una modificación del ensayo en placas microtituladoras para cultivos microbianos descrito por Geis *et al.* (1983). Los microorganismos indicadores empleados fueron *E. faecium* T136, en el caso de la purificación de la sustancia antimicrobiana de *E. faecium* P13, y *E. faecium* P13, en el caso de la purificación de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* T136. Los microorganismos indicadores se sembraron en caldo

MRS y se incubaron a 32°C durante 16 horas. Alícuotas de estos cultivos se diluyeron (1/400) en caldo MRS estéril, hasta una A_{620} de aproximadamente 0,1. En los primeros pocillos de las placas microtituladoras se depositaron 100 µl de las fracciones a analizar, realizándose a partir de ellas diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8, etc.) en caldo MRS; posteriormente, se añadieron a cada pocillo 150 µl del microorganismo indicador diluido y se incubaron las placas a 32°C durante 12-14 horas. Finalizada la incubación, se determinó espectrofotométricamente a 620 nm el crecimiento del microorganismo indicador, empleando un lector de placas microtituladoras. Una unidad de bacteriocina (UB) se define como el recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el desarrollo del microorganismo indicador (50% de la turbidez de un cultivo control del microorganismo indicador al que no se añadió bacteriocina).

Con los datos obtenidos, se elaboraron las tablas de purificación correspondientes, con los siguientes parámetros:

- (1) Volumen en ml de cada fracción.
- (2) Actividad antimicrobiana total (UB). Este valor se obtiene al multiplicar el valor UB/ml por el volumen en ml de la fracción correspondiente.
- (3) Actividad antimicrobiana específica. Corresponde al cociente entre la actividad antimicrobiana total y la absorbancia total a 254 nm.
- (4) Incremento de la actividad antimicrobiana específica. Corresponde al cociente entre la actividad antimicrobiana específica de cada fracción y la del sobrenadante.
- (5) Porcentaje de recuperación de bacteriocina. Equivale al porcentaje que representa la actividad antimicrobiana total de cada fracción frente a la del sobrenadante.

III.2.10.3.5. Determinación de la concentración de proteína (bacteriocina) de las muestras purificadas

La concentración de proteína de las muestras purificadas se determinó empleando el *kit* comercial de “Pierce-Chemicals”, basado en el método de Bradford (1976). La unión en medio ácido del colorante azul de Coomassie G-250 con las proteínas en disolución provoca en aquél un cambio de color de rojo-marrón a azul, el cual se cuantifica espectrofotométricamente. El reactivo azul brillante de Coomassie G-250 existe en tres formas en equilibrio: aniónica, neutra y catiónica, con picos de máxima absorbancia espectrofotométrica a 595, 650 y 470 nm, respectivamente; probablemente, son las formas aniónicas del colorante las que se unen a las proteínas, ya que cuando aquéllas se producen la absorbancia cambia de 465 a 595 nm.

III.2.10.3.5.1. Procedimiento

Los patrones empleados se obtuvieron a partir de la muestra de seroalbúmina bovina fracción 5 (SAB) (25 mg/ml) suministrada por “Pierce-Chemicals”, preparando diluciones en agua desionizada con concentraciones de 1, 2,5, 5, 10 y 15 mg/ml.

Realizadas las diluciones apropiadas de la solución patrón de SAB, se preparó un batería de tubos con 1ml de agua desionizada (control), 1 ml de una dilución 1/10 en agua desionizada de la muestra a valorar ó 1 ml de cada una de las diluciones de SAB. Se añadió a cada tubo 1 ml del reactivo colorimétrico azul brillante de Coomassie G-250, se agitaron suavemente y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos. Finalizada la incubación,

se determinó espectrofotométricamente la absorbancia de las muestras a 595 nm, elaborándose la correspondiente curva patrón, obtenida al representar la absorbancia frente a la concentración de proteína. La concentración de proteína de las muestras se determinó por interpolación del correspondiente valor de absorbancia en la recta de regresión de la curva patrón.

III.2.10.4. Optimización de la producción de las bacteriocinas de *E. faecium* T136 y purificación a homogeneidad de las mismas

III.2.10.4.1. Optimización de la producción de las bacteriocinas

La optimización de la producción de las bacteriocinas de *E. faecium* T136 se realizó en un tanque reactor de 3 l de capacidad integrado en un fermentador de mesa "B. Braun Biotech International". El tanque reactor con 2 l de caldo MRS ("Difco") con el pH ajustado a valores de 6,2; 5,7 ó 5,2 con HCl concentrado, así como algunos de los accesorios que integraban el fermentador, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 45 min. El tanque reactivo y sus accesorios se acoplaron al fermentador y, una vez atemperado el caldo nutritivo, se procedió a su inoculación con 2ml (0,1% v/v) de un cultivo de *E. faecium* T136 desarrollado en caldo MRS a 30°C durante 16 horas. El pH inicial del medio de cultivo se mantuvo constante a 6,2; 5,7 ó 5,2 durante el proceso de fermentación mediante el suministro continuado de NaOH 6N a través de una bomba peristáltica acoplada al fermentador. Teniendo en cuenta que tras la fermentación de 1 mol de glucosa (180 g) se producen 2 moles de ácido láctico y que para su neutralización son necesarios 2 moles de NaOH, se calculó que para neutralizar los 0,44 moles de ácido láctico producidos una vez que el cultivo hubiera consumido los 40 g iniciales de glucosa (0,22 moles), serían necesarios 73 ml de NaOH 6N. El consumo de glucosa durante el crecimiento del cultivo a lo largo del tiempo se monitorizó periódicamente por la disminución de los niveles de la solución de NaOH 6N. Para impedir que la falta de glucosa pudiera ser el factor limitante del crecimiento y/o de la producción de bacteriocinas de *E. faecium* T136, cuando el nivel de NaOH 6N disminuyó en 60 ml (consumo aproximado de glucosa 33 g) se añadieron nuevamente al cultivo 40 g de este hidrato de carbono como fuente de energía (100 ml de una solución de glucosa al 40%, previamente esterilizada con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro). En los tres ensayos realizados, los cultivos se desarrollaron a 30°C, en condiciones anaeróbicas (corriente de nitrógeno) y con agitación mecánica constante de 50 rpm. El periodo de incubación de los cultivos se estableció en función del valor del pH de cada fermentación (24 h para los cultivos de pH 6,2 y 5,7 y 63 h para el cultivo de pH 5,2).

Durante las fermentaciones bacterianas se tomaron muestras del cultivo, a intervalos regulares de tiempo, para determinar su absorbancia a 620 nm y la actividad antimicrobiana de los correspondientes sobrenadantes libres de células frente a *P. pentosaceus* FBB61 y *Lb. sake* 148 mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4).

III.2.10.4.2. Purificación de las bacteriocinas

El fundamento del proceso de purificación se explicó en la sección III.2.10.3.1. El proceso de purificación se realizó a temperatura ambiente salvo que se indique lo contrario. Alícuotas de las fracciones obtenidas durante la purificación se conservaron a 4°C para detectar y cuantificar

su actividad antimicrobiana, mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4), frente a *P. pentosaceus* FBB61 y *Lb. sake* 148. El procedimiento empleado se describe a continuación:

- 1) A partir de un cultivo de *E. faecium* T136 desarrollado en caldo MRS (“Difco”) a 30°C durante 16 horas se inocularon 2 ml (0,1% v/v) en 2 litros de caldo MRS (pH 5,7) (“Difco”) contenidos en el tanque reactor. A continuación el cultivo se incubó a 30°C en el fermentador a pH constante de 5,7 durante 18 horas.
- 2) El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm y 4°C durante 30 min para obtener el correspondiente sobrenadante libre de células (fracción I).
- 3) Esta fracción se cromatografió por interacción hidrofóbica empleando como matriz una resina de Amberlite XAD-16. Para ello, se añadieron 40 g (2%) de la resina al sobrenadante y la mezcla se mantuvo a 4°C con agitación suave durante 1 hora. Posteriormente, la muestra se trasvasó a una columna cromatográfica y se lavó con 400 ml de etanol al 40%, tras lo cual se procedió a la elución de las sustancias retenidas (fracción II) con 250 ml de isopropanol al 70%, pH 2,0.
- 4) Una vez lavado y empaquetado el gel SP-Sepharose Fast Flow en la columna cromatográfica la matriz se equilibró con 50 ml de HCl 1 N y se depositó lentamente la fracción II mediante el empleo de una pipeta de Pasteur. La fracción que abandonaba la matriz cromatográfica se recogió y se mantuvo a 4°C hasta su empleo. Posteriormente, la columna se lavó con 400 ml del tampón NaP, pH 5,8. La elución de los compuestos retenidos electrostáticamente en la columna se realizó aumentando la fuerza iónica, para lo cual se añadieron a la columna 50 ml de una solución de 1 M de NaCl en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción III.
- 5) Una vez lavado con agua desionizada e isopropanol y empaquetado el gel Octyl-Sepharose CL4B en la columna cromatográfica, la matriz se equilibró con 15 ml de una solución de sulfato amónico al 10 % (p/v) en tampón NaP, pH 5,8. A continuación, a la fracción III se le añadió también sulfato amónico, hasta una concentración final de un 10% (p/v), y se depositó en la columna. La fracción que abandonaba la matriz cromatográfica se recogió y se mantuvo a 4°C hasta su empleo. Seguidamente la columna se lavó con 15 ml del tampón de equilibrado y las sustancias hidrófobas retenidas se eluyeron con 10 ml de una solución de alcohol etílico al 70% (v/v) en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción IV.
- 6) A la muestra a cromatografiar (fracción IV) se le añadió ácido trifluoroacético, a una concentración final del 0,1% (v/v), y se hizo pasar a través de filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro. Posteriormente, la muestra se diluyó con tampón A (0,1% ATF en agua desionizada) hasta un volumen de 50 ml y se cargó en el *super-loop* de 50 ml del equipo de cromatografía FPLC, con ayuda de una bomba peristáltica. La columna de fase reversa PepRPC HR5/5 se colocó en el equipo de FPLC y se equilibró con el tampón A, tras lo que la muestra a cromatografiar se inyectó automáticamente a un flujo de 1 ml/minuto. La columna se lavó con tampón A hasta que la A_{280} alcanzó de nuevo la línea basal y la muestra se eluyó a un flujo de 0,5 ml/minuto, con un gradiente lineal de 0 a 100 de tampón A en tampón B, registrándose la A_{280} de las fracciones eluidas. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, y aquellas que la manifestaban se mezclaron y se diluyeron hasta 10 ml con tampón A, recromatografiándose con gradientes

isocráticos, hasta que se obtuvo un único pico de absorbancia con actividad antimicrobiana. A las fracciones cromatográficas finales se les añadió isopropanol a una concentración final del 50-60% (v/v) y se conservaron a -20°C hasta su empleo posterior.

A partir de los datos obtenidos, se elaboró la tabla de purificación correspondiente con los siguientes parámetros: volumen en ml de cada fracción, actividad antimicrobiana total (UB) y porcentaje de recuperación de bacteriocina.

II.2.10.5. Determinación de la composición y secuencia aminoacídica de las bacteriocinas

Las fracciones que contenían las bacteriocinas purificadas de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 se desecaron a vacío en un rotavapor y se enviaron al Dr. Knut Sletten del Centro de Biotecnología de la Universidad de Oslo para determinar su composición y secuencia aminoacídica.

La composición aminoacídica de las bacteriocinas se determinó empleando un analizador automático de aminoácidos ("Biotronic"). Las muestras se hidrolizaron completamente con exceso de HCl 6 N por calentamiento a 100-120°C durante 10-24 horas. Con este tratamiento el triptófano se destruye, la concentración final de treonina y serina disminuyen ligeramente y la asparragina y la glutamina se hidrolizan, originándose ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. El análisis automático se realizó mediante una columna de intercambio catiónico con una resina de poliestireno sulfonada como matriz cromatográfica. Una vez equilibrada la resina con una solución de NaOH, se aplicó la mezcla de aminoácidos de la muestra a analizar (pH 3,0) y se procedió a la elución de los distintos aminoácidos con soluciones de pH y concentraciones de sal crecientes. Los aminoácidos más básicos (lisina, arginina, histidina), se adhieren fuertemente, mientras que los más ácidos (glutámico, aspártico) se fijan débilmente. Las diversas fracciones eluidas se analizaron cuantitativamente mediante una reacción colorimétrica empleando ninhidrina como reactivo colorimétrico.

La secuencia aminoacídica de las bacteriocinas se determinó mediante degradación de Edman sometiéndolas a ciclos consecutivos de degradación en un microsecuenciador de fase gaseosa conectado a un analizador automático ("Applied Biosystems") de derivados feniltiohidantoína-aminoácido por sistema HPLC (Cornwell *et al.*, 1988). En la reacción de Edman el feniltioisocianato, bajo condiciones alcalinas, reacciona con el grupo amino terminal no cargado del péptido formando un feniltiocarbamilato-aminoácido, el cual bajo condiciones ácidas suaves se libera en forma de un derivado cíclico de la feniltiohidantoína (PTH), dejando el resto de la cadena peptídica intacta. El derivado PTH-aminoácido liberado se identifica cromatográficamente por medio de un sistema HPLC. Cuando el extremo N-terminal de la cadena peptídica está bloqueado por la presencia de aminoácidos modificados, la muestra se somete a un tratamiento con bromuro de cianógeno (Sletten, 1974), que rompe la cadena peptídica solamente en el lado carboxílico de los residuos de metionina, sometiéndose posteriormente el fragmento C-terminal de la cadena a la degradación de Edman. Los aminoácidos modificados, como la lantionina, β metil-lantionina y/o sus precursores, no se detectan por la degradación de Edman, por lo que la muestra se somete a una oxidación con ácido per fórmico, que producirá ácido cítrico a partir de la lantionina.

III.2.10.6. Determinación del tamaño molecular de las bacteriocinas por espectrometría de masas

Muestras que contenían las bacteriocinas purificadas de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136, se enviaron al Dr. J. Metzger del Instituto de Química Orgánica de la Universidad Eberhard-Karls de Tübingen (Alemania) con el objeto de determinar su tamaño molecular mediante espectrometría de masas.

La base de la espectrometría de masas es la producción de iones, los cuales son separados o filtrados de acuerdo a su relación masa/carga (M/Z) y detectados posteriormente. Los espectrómetros de masas son instrumentos altamente sofisticados y computerizados que, básicamente, constan de cinco partes: la zona de introducción de la muestra, el lugar de ionización de la misma, el analizador de la masa, la zona de detección de iones y el procesador de los datos obtenidos.

III.2.10.7. Efecto del ditiotritol (DTT) en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas

Los grupos tiol o sulhidrilo (-SH) de los residuos de cisteína son extremadamente susceptibles a la oxidación por el oxígeno atmosférico en presencia de sales de hierro u otros oxidantes suaves. El producto de la oxidación es la cistina, en la que el enlace disulfuro constituye un puente covalente entre dos restos de cisteína (-S-S-). La cistina desempeña un papel esencial en la estructura de la proteína, ya que su grupo disulfuro actúa como un enlace covalente transversal entre dos cadenas polipeptídicas o entre dos puntos de una misma cadena. Los enlaces disulfuro establecidos pueden escindirse por la acción de agentes reductores, tales como el ditiotritol (DTT) o el β -mercaptoetanol.

III.2.10.7.1. Microorganismos indicadores

Los microorganismos indicadores empleados fueron *E. faecium* T136, en el caso de la enterocina P y *E. faecium* P13, en los casos de las enterocinas A y B.

III.2.10.7.2. Ensayos en placas microtituladoras

La determinación del efecto del DTT en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se realizó empleando un ensayo en placas microtituladoras, similar al descrito en la sección III.2.10.3.4. Los microorganismos indicadores se desarrollaron en caldo MRS ("Difco") a 30°C durante 16 horas y, posteriormente, se diluyeron (1/400) en caldo MRS-DTT 10 mM hasta una absorbancia a 620 nm de aproximadamente 0,1. En los primeros pocillos de las placas microtituladoras se depositaron 9 μ l de las bacteriocinas purificadas (isopropanol al 50%) y 1 μ l de MRS-DTT 1M, completando con caldo MRS hasta un volumen final de 100 μ l. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en caldo MRS-DTT 10 mM. Como controles se emplearon 9 μ l de isopropanol al 50% y 1 μ l de MRS-DTT 1M, así como, 9 μ l de las bacteriocinas purificadas y 1 μ l de MRS. Una vez diluidas las bacteriocinas y los controles se añadieron a cada pocillo 150 μ l del microorganismo indicador diluido en caldo MRS o MRS-DTT 10 mM y las placas se incubaron a 30°C durante 12-14 horas. Finalizada la incubación, se

determinó espectrofotométricamente a 620 nm el crecimiento de los microorganismos indicadores, empleando un lector de placas microtituladoras. La actividad antimicrobiana de las muestras se expresó en UB/ml, determinándose el porcentaje de reducción de esta actividad en las muestras tratadas con DTT.

III.2.10.8. Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM) de las bacteriocinas purificadas a homogeneidad frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria

III.2.10.8.1. Microorganismos indicadores

Las bacterias Gram-positivas empleadas como microorganismos indicadores, así como los medios de cultivo y condiciones de incubación empleados para su desarrollo, se muestran en la Tabla III.1.

III.2.10.8.2. Ensayos en placas microtituladoras

La determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM) de las bacteriocinas se realizó empleando un ensayo en placas microtituladoras, similar al descrito en las secciones III.2.10.3.4 y III.2.10.7. Los microorganismos indicadores se desarrollaron en el medio apropiado y a la temperatura adecuada durante 16 horas y posteriormente se diluyeron (1/400) en el caldo estéril correspondiente, hasta una A_{620} de aproximadamente 0,1. En los primeros pocillos de las placas microtituladoras se depositaron alícuotas, de concentración conocida, de las bacteriocinas purificadas, completando con el caldo estéril adecuado hasta un volumen final de 100 μ l. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en el caldo correspondiente y, seguidamente, se añadieron a cada pocillo 150 μ l del microorganismo indicador. Las placas se incubaron, en las condiciones de temperatura y tensión de oxígeno requeridas por los microorganismos indicadores, durante 12 horas, en el caso de las bacterias lácticas, de *Micrococcus varians* (*M. varians*) y de los microorganismos anaerobios obligados, y durante 6/8 horas, en el caso de *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Ls. innocua*, *Ls. monocytogenes*, *St. carnosus* y *St. aureus*. Finalizada la incubación, se determinó espectrofotométricamente a 620 nm el crecimiento de los microorganismos indicadores, empleando un lector de placas microtituladoras. La CIM se define como la concentración de bacteriocina (ng/ml) que inhibe en un 50% el desarrollo del microorganismo indicador.

III.2.11. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS BACTERIOCINAS DE *E. faecium* P13 Y *E. faecium* T136

III.2.11.1. Obtención de mutantes de *E. faecium* P13 deficientes en la producción de bacteriocina y/o en la inmunidad a la misma

Las bacterias contienen un único cromosoma con información suficiente para la mayor parte de sus funciones celulares pero además tienen otras moléculas de ADN denominadas plásmidos, portadoras de información genética complementaria a la que aporta el cromosoma. Los plásmidos son moléculas de ADN de cadena doble circular covalentemente cerrada (ccc) con

superenrollamiento negativo que actúan como unidades genéticas accesorias que se replican y heredan independientemente del cromosoma bacteriano. Los plásmidos confieren una gran variedad de fenotipos a la célula hospedadora, entre los que se encuentran la resistencia a antibióticos, la degradación de compuestos aromáticos, la fermentación de azúcares, la fijación del nitrógeno y la producción de enterotoxinas, hemolisinas, enzimas de restricción y bacteriocinas (Old y Primrose, 1987).

Mediante el empleo de agentes mutagénicos como el ácido nitroso o los análogos de las bases, entre otros, se puede inducir un cambio en la secuencia de bases del ADN y por tanto un cambio en el producto codificado por ese gen (mutación); asimismo, con otros agentes mutagénicos como la acriflavina y el bromuro de etidio, o mediante tratamientos con novobiocina o con temperaturas elevadas, los plásmidos pueden eliminarse de las células hospedadoras (fenómeno denominado curación) (Tagg *et al.*, 1976).

La cepa *E. faecium* P13 presentaba en su estado salvaje los fenotipos Bac⁺ e Inm⁺, donde, Bac⁺ se refiere a la capacidad de *E. faecium* P13 de producir bacteriocina e Inm⁺ indica la capacidad que dicho microorganismo presenta de sobrevivir en presencia de su propia bacteriocina, es decir, su inmunidad.

III.2.11.1.1. Aislamiento de colonias de *E. faecium* P13 de fenotipos Bac⁺Inm⁺

A partir de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C durante 16 horas se sembraron en superficie placas con agar MRS y se incubaron a 32°C durante 48 horas. Un total de 24 de las colonias se recogieron asépticamente, por duplicado, para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *E. faecium* T136, mediante la técnica de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura (sección III.2.3.1). De las colonias con actividad antimicrobiana (Bac⁺) se seleccionaron al azar 10 para confirmar este fenotipo. Para ello se cultivaron en caldo MRS a 32°C durante 16 horas y se evaluó la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes frente a *E. faecium* T136, empleando la técnica de difusión en agar (sección III.2.3.2). La inmunidad de los aislados a la bacteriocina (Inm⁺) se determinó mediante la misma técnica, evaluándose la sensibilidad de los 10 cultivos con fenotipo Bac⁺ a un sobrenadante Bac⁺ de *E. faecium* P13.

Uno de los aislados con fenotipos Bac⁺Inm⁺ se conservó a -20 y a -85°C para tratarlo posteriormente con novobiocina y determinar su efecto en los fenotipos Bac e Inm y en su perfil plasmídico.

III.2.11.1.2. Tratamiento de los cultivos con novobiocina y detección de las colonias de fenotipos Bac⁻Inm⁻

A partir de una solución de novobiocina de 10 mg/ml se prepararon tubos con 10 ml de caldo MRS y con concentraciones de novobiocina de 1,0; 2,5; 5,0 y 7,5 µg/ml. Los tubos se inocularon con 1x10⁶ ufc del cultivo aislado de *E. faecium* P13 con fenotipos Bac⁺Inm⁺ y se incubaron a 32°C durante 72 horas. Finalizada la incubación se sembraron diluciones adecuadas de estos cultivos en placas de agar MRS, efectuándose el recuento de ufc/ml y seleccionándose al azar 48 colonias de cada tratamiento. La actividad antimicrobiana de las colonias se determinó mediante la técnica de antagonismo microbiano por siembra en picadura (sección III.2.3.1),

empleando *E. faecium* T136 como microorganismo indicador. Las colonias que no mostraron actividad antimicrobiana (Bac⁻) se recuperaron de las placas control y se desarrollaron en caldo MRS a 32°C durante 16h, obteniéndose los correspondientes sobrenadantes. Paralelamente, mediante la técnica de difusión en agar, se confirmó el fenotipo Bac⁻ de los cultivos y se determinó si habían perdido la inmunidad a la bacteriocina. Para confirmar la estabilidad de los nuevos fenotipos Bac⁻Inm⁻, se realizaron 3 transferencias consecutivas de los cultivos en caldo MRS y se determinó la actividad inhibidora de sus sobrenadantes frente a *E. faecium* T136 y la inmunidad de los cultivos a un sobrenadante de *E. faecium* P13 de fenotipo Bac⁺, mediante un ensayo en placas microtituladoras similar al descrito en la sección III.2.10.3.4.

Los cultivos con fenotipos Bac⁻Inm⁻ se mantuvieron a -20 y a -85°C para evaluar más tarde las variaciones en sus perfiles plasmídicos y establecer la posible relación entre la pérdida de los fenotipos Bac⁺ e Inm⁺ y la de algún plásmido específico.

III.2.11.2. Aislamiento y visualización del ADN plasmídico y cromosómico de *E. faecium* P13, de sus mutantes seleccionados y de *E. faecium* T136

Las células bacterianas se tratan con una solución de EDTA, agente quelante de cationes divalentes, para desestabilizar la membrana externa e inhibir las ADNasas y, posteriormente, con lisozima, que degrada la mureína, para debilitar su pared. Más tarde, las células se tratan con el detergente SDS que produce la lisis de la membrana citoplásmica. A continuación, se adiciona una solución de NaOH para desnaturalizar las proteínas y el ADN cromosómico, pero no las formas covalentes cerradas del ADN plasmídico. Posteriormente, se neutraliza el medio de lisis, de manera que el ADN cromosómico se renaturaliza formando agregados insolubles que precipitan. Simultáneamente, la elevada concentración de cloruro sódico provoca la precipitación de los complejos de elevado peso molecular de SDS-proteínas y del ARN de elevado peso molecular. Finalizado el tratamiento, las moléculas de ADN plasmídico circular covalentemente cerrado permanecen en estado nativo y en solución, mientras que las macromoléculas contaminantes co-precipitan. El precipitado se elimina por centrifugación y los plásmidos se concentran por precipitación con etanol.

El aislamiento del ADN plasmídico y cromosómico de *E. faecium* P13, de sus mutantes seleccionados y de *E. faecium* T136 se realizó empleando la técnica para el aislamiento de plásmidos de gran tamaño de estreptococos lácticos, descrita por Anderson y McKay (1983).

III.2.11.2.1. Aislamiento del ADN plasmídico y cromosómico

- (1) Las cepas a analizar se desarrollaron en 10 ml de caldo MRS a 32°C durante 14-16 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm y 4°C durante 10 minutos, lavándose las células con 1 ml (1/10 del volumen del cultivo) de solución salina. La suspensión se trasvasó a un tubo de Eppendorf y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones descritas anteriormente, efectuándose un segundo lavado de las células con 1 ml del tampón STE.
- (2) El sedimento se resuspendió en 380 µl de tampón STE y 96 µl de solución de lisozima y, tras agitar enérgicamente, se mantuvo en un baño termostático a 37°C durante 30 min.
- (3) A la mezcla anterior se le añadieron 48 µl del tampón ET y 28 µl de solución de SDS,

mezclando en seguida con suavidad. Posteriormente, la muestra se incubó en un baño termostático a 37°C durante 5 min. Finalizada la incubación, la solución resultante ha de ser clara y viscosa.

- (4) A la muestra lisada se le añadieron 28 µl de solución NaOH 3M recién preparada y se mantuvo en un agitador orbital a 250 rpm durante 10 min. A continuación se añadieron 50 µl de Tris 2 M, pH 7,0 y se agitó nuevamente durante 3 min, tras lo que se añadieron 72 µl de NaCl 5M.
- (5) A la mezcla anterior se le añadió el mismo volumen de una solución de fenol-Tris y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Tras la centrifugación, se observaron tres fases: una fase acuosa superior transparente en la que se encuentran los plásmidos, una interfase opaca blanquecina en la que están los conglomerados proteicos y una fase inferior amarilla que contiene el fenol. La fase superior se trasvasó a un tubo de Eppendorf y se le añadió el mismo volumen de fenol-Tris cloroformo-isoamílico (1:1), centrifugándose a continuación a 12.000 rpm durante 5 min. La fase superior se trasvasó nuevamente a un tubo de Eppendorf y se le añadió el mismo volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), centrifugándose a continuación a 12.000 rpm durante 5 min.
- (6) Finalizada la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 2-3 volúmenes de etanol preenfriado a -20°C. Las muestras se incubaron a -85°C durante 1 hora para precipitar el ADN plasmídico y, posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 30 min.
- (7) A continuación, se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) en agua desionizada, tras lo cual se llevó a un desecador de vacío, donde se mantuvo durante 5-10 min.
- (8) Finalmente, el sedimento desecado se resuspendió en 20-30 µl de tampón TER y se incubó a 37°C durante 20 min para eliminar el ARN residual. La muestra se conservó a -20°C hasta su empleo.

Para favorecer el aislamiento del ADN cromosómico se procede de igual modo que en el protocolo anterior pero eliminándose las adiciones de NaOH 3M y NaCl 5M. El cloruro sódico se añade en el momento en el que se adicionan los 2-3 volúmenes de etanol preenfriado a -20°C. El sedimento final se resuspende en 50-100 µl de tampón TER.

III.2.11.2.2. Visualización del ADN plasmídico y cromosómico

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica muy utilizada para la visualización, separación y caracterización de moléculas de ácidos nucleicos por ser una metodología simple, rápida y de alta resolución. La agarosa es una sustancia capaz de formar geles con rigidez suficiente para ser manipulados a partir del 0,2% y que, a diferencia de la acrilamida, no polimeriza al gelificar sino que simplemente sufre un cambio de estado, por lo que la variabilidad de la polimerización desaparece. Los grupos fosfato del ADN, a pH neutro o alcalino, confieren a las moléculas una carga neta negativa, de manera que el ADN migra hacia el ánodo cuando el gel se coloca en un campo eléctrico. La movilidad del ADN en un gel de agarosa es independiente de la composición de sus bases y de la temperatura; no obstante, depende de una serie de factores como, entre otros, el tamaño molecular, la conformación de la molécula (covalente circular cerrada o superenrollada, circular abierta o relajada y lineal), la concentración

de agarosa, el voltaje de la corriente aplicada, la fuerza iónica del tampón de electroforesis empleado y la presencia de colorantes intercalantes como el bromuro de etidio.

III.2.11.2.2.1. Preparación de las muestras y de los marcadores de tamaño molecular conocido

A las muestras que se van a someter a electroforesis se les añadió la solución de transporte 10 x (sección III.1.5.5.4). En lo que respecta a los marcadores de tamaño molecular conocido, se depositó 1 µl de la solución estándar adecuada (sección III.1.4.3) en un tubo de Eppendorf y se añadieron 8 µl del tampón TAE 1x y 1 µl de la solución de transporte 10x.

La solución de transporte 10x aumenta la densidad de las muestras, facilitando que el ADN se introduzca adecuadamente en los pocillos del gel, y además el azul de bromofenol que contiene permite observar el avance del frente electroforético.

III.2.11.2.2.2. Preparación de los geles de agarosa con 0.3 µg/ml de BrEt

Para preparar 100 ml de gel de agarosa al 0,8% o al 2% se suspendieron 0,8 ó 2 g de la agarosa correspondiente en 100 ml del tampón TAE1x y se calentó la mezcla en el microondas hasta conseguir una solución transparente con la agarosa perfectamente disuelta. La solución se conservó en un baño de agua termostatado a 62°C. Inmediatamente antes de su empleo, se añadieron 3 µl de la solución de BrEt (10 mg/ml) por cada 100 ml de gel de agarosa. En las bandejas de electroforesis se vertieron unos 50 ml de gel de agarosa con BrEt (0,3 µg/ml) atemperado a 50°C, colocándose posteriormente el peine formador de los pocillos. El gel se mantuvo a temperatura ambiente durante 45 min para permitir su solidificación.

III.2.11.2.2.3. Electroforesis en geles de agarosa

Una vez solidificado el gel y retirado el peine, se colocó el gel en la cubeta de electroforesis submarina, cubriéndolo completamente con el tampón TAE 1x. A continuación, con ayuda de una pipeta automática, se depositaron las muestras en los pocillos correspondientes y se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 1 hora y 15 min. Finalizada la electroforesis se extrajo el gel de la cubeta y se procedió a la visualización del ADN.

III.2.11.2.2.4. Visualización y determinación del tamaño molecular de las moléculas de ADN

El ADN se visualizó en el gel con ayuda de un transiluminador de luz UV en un cámara oscura. Los geles se fotografiaron con una cámara instantánea "Polaroid" dotada de una película en blanco y negro y un filtro para ultravioleta.

De modo general, se admite que la migración de las moléculas de ADN en los geles de agarosa es inversamente proporcional al logaritmo decimal de su tamaño molecular (Helling *et al.*, 1974). Por ello, el tamaño molecular (pb) de los plásmidos y de los fragmentos de ADN visibles en los geles se determinó de la ecuación de la recta de regresión obtenida al representar, gráficamente los valores logarítmicos de los tamaños moleculares (pb) de los marcadores frente a las correspondientes distancias migradas (cm).

III.2.11.3. Análisis de restricción del ADN total de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136

Las endonucleasas de restricción (ER) son enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster del ADN y que se caracterizan porque producen un corte en cada cadena del ADN dúplex, y lo hacen de forma específica, tras reconocer una secuencia diana o blanco. La secuencia de reconocimiento de las endonucleasas de restricción es generalmente una secuencia palindrómica, es decir que puede dividirse en dos mitades complementarias. Las endonucleasas de restricción de la clase I reconocen una secuencia específica, pero cortan en lugares que pueden encontrarse a varios nucleótidos de aquélla. En cambio, las endonucleasas de la clase II constituyen una especie de bisturí molecular que corta el ADN en lugares específicos. Cuando el lugar de corte del ADN es el mismo en las dos cadenas se producen extremos planos, mientras que en el caso contrario se generan extremos cohesivos, que pueden ser protuberantes en 3' ó en 5'.

El ADN total de *E. faecium* P13 se trató con *DraI*, *RsaI* y *SspI* y el ADN total de *E. faecium* T136 se trató además con *HincII*, *StuI*, *FspI*, *NaeI* y *EcoRI*. Los enzimas de restricción empleados y sus correspondientes tampones comerciales se describieron en la sección III.1.3. El tratamiento del ADN con los enzimas *DraI*, *RsaI*, *SspI*, *HincII*, *StuI*, *FspI* y *NaeI* genera un conjunto de fragmentos lineales con extremos planos y, por el contrario, al tratar el ADN con el *EcoRI* se generan fragmentos lineales con extremos cohesivos. Los tratamientos del ADN total de las dos cepas con los ER se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989), como se indica a continuación:

- (1) Para cada tratamiento enzimático se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de Eppendorf:

| | |
|-----------------------|---------|
| ADN total | 3,0 µl |
| Tampón 10x | 2,0 µl |
| Agua desionizada | 14,0 µl |
| Enzima de restricción | 1,0 µl |
| <hr/> | |
| Volumen de reacción | 20,0 µl |

- (2) Las muestras se agitaron suavemente por inversión de los tubos y se incubaron en un baño de agua termostático a 37°C durante 2 horas.
- (3) Finalizada la incubación, las reacciones enzimáticas se detuvieron manteniendo las muestras en un baño de agua termostático a 65°C durante 20 min.
- (4) Las muestras se conservaron a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.4. Obtención y preparación del vector de ligamiento pBluescript II SK+

En ingeniería genética, los plásmidos y fagémidos se utilizan principalmente como vectores de ligamiento o de clonación de moléculas de ADN exógeno denominadas insertos y, generalmente, contienen un replicón, un marcador selectivo y uno o varios lugares de clonación. El replicón es un fragmento de ADN que contiene un origen de replicación y los genes que codifican las proteínas y el ARN necesarios para la replicación del fagémido; el marcador suele ser un gen que codifica la resistencia a algún antibiótico y el punto de clonación es un fragmento con secuencias diana de diversos enzimas de restricción, en el que se introduce el inserto sin interferir en la replicación del plásmido ni en la adquisición del fenotipo marcador en las células

hospedadoras. El vector de ligación empleado en este trabajo fue el fagémido p-Bluescript II SK+ (en adelante, pBluescript) suministrado por “Stratagene”.

III.2.11.4.1. Obtención del vector de ligamiento pBluescript II SK+

Con el objeto de disponer de un *stock* del fagémido pBluescript para emplearlo como vector de ligación en diversas experiencias, se prepararon células competentes de *E. coli* DH5 α (células permeables a la entrada de ADN exógeno) y, a continuación, se transformaron químicamente con el fagémido pBluescript. Posteriormente, las células transformadas se desarrollaron en un medio de cultivo con el antibiótico adecuado y se aisló y purificó su ADN plasmídico.

III.2.11.4.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Las células de *E. coli* DH5 α se hicieron competentes siguiendo el protocolo descrito por Inoue *et al.* (1990), como se indica a continuación:

- (1) A partir de un *stock* de *E. coli* DH5 α , mantenido a -80°C, se sembraron 10 ml de caldo SOB y se incubaron a 37°C con agitación a 300 rpm durante 18 horas.
- (2) Finalizada la incubación, se sembró 1 ml de este cultivo en 100 ml de caldo SOB, incubándose a 37°C y a 300 rpm hasta que el cultivo alcanzó una A₆₂₀ de 0,5-0,6. El cultivo se enfrió a 0°C, manteniéndolo 10 minutos en un baño con hielo fundente. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron siempre en un baño con hielo fundente y con las soluciones preenfriadas a 0°C.
- (3) El cultivo enfriado se centrifugó a 4.000 rpm y 4°C durante 10 min, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se dejó el tubo unos minutos en posición invertida para eliminar completamente el caldo de cultivo. Las células se resuspendieron en 35 ml (aproximadamente 1/3 del volumen original del cultivo) de tampón TB estéril y el tubo se mantuvo 10 minutos en un baño de hielo fundente, centrifugándose posteriormente a 4.000 rpm y 4°C durante 10 min.
- (4) A continuación, las células se resuspendieron en 4 ml (1/25 del volumen original del cultivo) de tampón TB y se añadió gradualmente dimetil sulfóxido (DMSO), hasta una concentración final del 7% (v/v). Las células resuspendidas se mantuvieron en un baño de hielo fundente durante 10 min y, seguidamente, se distribuyeron en alícuotas de 200 μ l, que se conservaron a -80°C hasta su empleo.

III.2.11.4.1.2. Transformación química de *E. coli* DH5 α con el fagémido pBluescript II SK+

Las células competentes de *E. coli* DH5 α se transformaron químicamente según el protocolo de “Stratagene” descrito en el *kit* “Epicurian Coli Competent and Supercompetent Cells”.

El procedimiento empleado se indica a continuación:

- (1) En un tubo de polipropileno Falcon-2059 de 15 ml de capacidad preenfriado en hielo, se depositaron 100 μ l de la suspensión de células competentes y 1 μ l del vector pBluescript y se agitó concéntrica y suavemente. A continuación, el tubo se incubó en un baño de hielo fundente durante 30 min, posteriormente en un baño de agua termostatado a 42°C durante 50 seg y por último en un baño de hielo fundente durante 2 min.

- (2) A continuación, se añadieron 900 µl de caldo SOC precalentado a 42°C y la suspensión bacteriana se incubó en un agitador orbital a 37°C y 300 rpm durante 1 hora.
- (3) Posteriormente, se prepararon diluciones del cultivo en caldo SOC y se sembraron con ayuda de un asa de Drigalski en agar sólido LB con ampicilina (Amp, 50 µg/ml) como agente selectivo. Las placas de Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas. *E. coli* DH5α es sensible a la ampicilina por lo que sólo se desarrollan aquellas colonias que han recibido el fagémido pBluescript, que porta el gen de la resistencia a este antibiótico.
- (4) De las colonias desarrolladas en las placas con agar sólido LB-Amp (50 µg/ml) se seleccionaron 5 y, con ayuda de un asa de platino, se inocularon en 5 ml de caldo LB- Amp (100 µg/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C y 300 rpm durante 24 h. Transcurridas las 8-10 primeras horas de incubación se añadió nuevamente ampicilina a los cultivos, con el objeto de impedir la desaparición del agente selectivo por su degradación enzimática por la β-lactamasa.
- (5) Para garantizar la conservación de los microorganismos transformados con el fagémido pBluescript se prepararon *stocks* de los 5 cultivos en el caldo LB-Amp glicerinado y se conservaron a -20 y -85°C.

III.2.11.4.1.3. Aislamiento y purificación del fagémido pBluescript II SK+

El aislamiento y la purificación del fagémido pBluescript de las células de *E. coli* DH5α transformadas químicamente se realizó empleando el *kit* Wizard Minipreps DNA Purification System de "Promega". Todas las etapas de la purificación se realizaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

El procedimiento empleado se muestra a continuación:

- (1) De un cultivo de *E. coli* DH5α desarrollado en 5 ml de caldo LB-Amp (50 µg/ml) durante 16 horas, se centrifugaron 3 ml a 13.000 rpm durante 2 min; a continuación, las células se resuspendieron en 200 µl del tampón de resuspensión y la mezcla se trasvasó a un tubo de Eppendorf.
- (2) Se añadieron 200 µl de la solución de lisis y el contenido del tubo se mezcló, invirtiéndolo suavemente varias veces, hasta obtener una solución clara y viscosa.
- (3) A la muestra lisada se le añadieron 200 µl de la solución de neutralización y el contenido del tubo se mezcló, invirtiéndolo suavemente varias veces.
- (4) La muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min, tras lo cual el sedimento (contiene los complejos SDS-proteínas, el ADN cromosómico, el ARN macromolecular y otros detrito celulares) se desechó y el sobrenadante, que contiene los plásmidos, se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf.
- (5) Posteriormente, se añadió 1 ml de la solución de purificación con resina de sílica al sobrenadante y se mezcló agitando el tubo por inversión.
- (6) Paralelamente, se preparó un sistema de vacío consistente en un matraz conectado a una bomba; en el cuello del matraz se colocó un tapón de goma en el que se dispuso una aguja hipodérmica, a la que se insertó una minicolumna y a ésta una jeringa hipodérmica de 3 ml. La mezcla anterior se aplicó a la jeringa y, conectando la bomba de vacío, se hizo pasar a través de la columna.

- (7) La minicolumna se lavó, empleando la bomba de vacío, con 2 ml de solución de lavado.
- (8) A continuación se volvió a conectar el vacío durante 30 seg para secar la resina y, posteriormente, se depositó la minicolumna sobre un tubo de Eppendorf y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min para eliminar los posibles restos de solución de lavado.
- (9) La minicolumna se transfirió de nuevo a un tubo de Eppendorf y se depositaron 50 µl de tampón TE precalentado a 65°C, manteniéndose a temperatura ambiente durante 1 min. El ADN de las minicolumnas se eluyó por centrifugación a 13.000 rpm durante 30 seg.
- (10) A continuación, se realizó la electroforesis de 1 µl de la muestra en un gel de agarosa al 0,8% (v/v), con el objeto de visualizar el fragmento de 2.961 pb correspondiente al vector pBluescript. La muestra de plásmidos se conservó a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.4.2. Preparación del vector de ligamiento pBluescript II SK+

Una vez obtenido el fagémido pBluescript y como paso previo a su empleo como vector de ligamiento es necesario tratarlo con ER que permitan obtener el fagémido linealizado con extremos compatibles con los del ADN que se pretende insertar y, a continuación, realizar un tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización.

III.2.11.4.2.1. Tratamiento con enzimas de restricción

El fagémido pBluescript presenta un *polilinker* con 21 dianas de diferentes enzimas de restricción. En este trabajo el vector se trató con *HincII* y *EcoRI*. El sitio de corte de *HincII* es el mismo en las dos cadenas de ADN, por lo que tras su actuación se obtiene el vector linealizado con extremos planos. El sitio de corte de *EcoRI* no es el mismo en las dos cadenas de ADN, por lo que tras su actuación se genera el vector linealizado con extremos cohesivos.

El análisis de restricción se realizó según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), como se indica a continuación:

- (1) Para cada tratamiento enzimático se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de Eppendorf:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| ADN plasmídico (fagémido pBluescript) | 8,0 µl |
| Tampón 10x del enzima correspondiente | 2,0 µl |
| Agua desionizada | 8,5 µl |
| Enzima de restricción | 1,5 µl |
| <hr/> | |
| Volumen de reacción | 20,0 µl |

- (2) Las mezclas se agitaron por inversión de los tubos y, posteriormente, se incubaron en un baño de agua termostatado a 37°C durante 2 horas.

III.2.11.4.2.2. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Una vez realizado el análisis de restricción, el vector linealizado se trató con fosfatasa alcalina de ternero para desfosforilar sus extremos 5' y evitar de este modo su recircularización.

El tratamiento se realizó según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), procediendo como se indica a continuación:

- (1) A la muestra anterior con el vector tratado con ER (20µl) se le añadió:

| | |
|------------------|---------|
| Agua desionizada | 24,0 µl |
|------------------|---------|

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Tampón CIP 10x ("Promega") | 5,0 µl |
| Enzima fosfatasa alcalina ("Promega") | 1,0 µl |
| <hr/> | |
| Volumen de reacción | 50,0 µl |

- (2) La mezcla se agitó suavemente por inversión del tubo y se incubó en un baño termostático a 37°C durante 30 min.
- (3) Finalizada la incubación se detuvieron las reacciones enzimáticas manteniendo la muestra en un baño de agua termostático a 75°C durante 12 min.
- (4) A continuación, la muestra se precipitó y concentró, para lo cual ésta se llevó a un volumen final de 100 µl con agua desionizada y se le añadió un 10% de una solución de acetato sódico 3N, pH 7,0 y 3 volúmenes de alcohol etílico a -20°C. Tras agitarse suavemente por inversión, el tubo se mantuvo a -20°C durante 16 horas, centrifugándose posteriormente a 13.000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y se desechó, mientras que el sedimento se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 70% (v/v) en agua desionizada y se desecó a vacío durante 5 minutos. La muestra desecada se resuspendió en 20 µl del tampón TE, pH 7,0. Con el objeto de confirmar la digestión del vector, se analizó 1 µl de la muestra en un gel de agarosa al 0,8% (v/v). La muestra se conservó a -20°C hasta su empleo como vector de ligamiento.

III.2.11.5. Ligamiento de los fragmentos de restricción del ADN total de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 en el fagémido pBluescript II SK+

Los fragmentos de restricción del ADN total de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 se ligaron en el fagémido pBluescript linealizado, con los extremos planos o cohesivos en función de los ER empleados para la digestión del ADN, en una reacción catalizada por el enzima ADN-ligasa del bacteriófago T4 y en presencia de ATP.

El tratamiento se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), como se indica a continuación:

- (1) Para cada tratamiento se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de Eppendorf:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Muestra del ADN a insertar | 5,0 µl |
| Agua desionizada | 9,0 µl |
| Vector linealizado (0,3 µg) | 3,0 µl |
| Tampón T4 ADN ligasa 10x ("Promega") | 2,0 µl |
| T4 ADN ligasa ("Promega") | 1,0 µl |
| <hr/> | |
| Volumen de reacción | 20,0 µl |

- (2) Las mezclas se agitaron suavemente por inversión de los tubos y se incubaron en un baño termostático a 15°C durante 16 horas. Finalizada la incubación, las muestras se conservaron a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.6. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

III.2.11.6.1. Fundamento de la técnica de PCR y etapas de la reacción

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) (Mulis *et al.*, 1987), es una técnica muy útil en biología molecular ya que permite amplificar

hasta un millón de veces una secuencia determinada de ADN, a partir de cantidades muy pequeñas de muestra original. Los productos amplificados se analizan mediante su visualización en geles de agarosa o poliacrilamida, o bien determinando su secuencia nucleotídica.

La técnica de PCR requiere el empleo de dos oligonucleótidos (cebadores o primeros), de aproximadamente 15-20 nucleótidos, que hibriden en ambos extremos del fragmento a amplificar pero en cadenas diferentes. El ADN que contiene la secuencia a amplificar se desnaturaliza por calor, se hibrida con los oligonucleótidos y se incuba con ADN polimerasa y desoxinucleótidos (dNTP). Una vez producida la hibridación de los dos oligonucleótidos al molde de ADN, el enzima sintetiza dos nuevas cadenas de ADN extendiendo cada uno de los primeros. Tras este primer ciclo se obtienen las dos primeras copias de la secuencia comprendida entre ambos primeros que serán la base para el próximo ciclo de amplificación. Sucesivos ciclos de amplificación, que comprenden las etapas de desnaturalización, hibridación y polimerización, generan exponencialmente copias del segmento de ADN comprendido entre los dos cebadores.

Cuando el ADN a amplificar está integrado en un cromosoma o en un plásmido conviene, antes de añadir la ADN polimerasa y de iniciar los ciclos de amplificación, someter la muestra a una elevada temperatura, generalmente 97°C durante 2 min, con el fin de eliminar las estructuras secundarias, las cuales podrían interferir en los ciclos posteriores de amplificación del ADN.

Durante la etapa de hibridación, la unión de los cebadores a una determinada secuencia tiene lugar por la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias. El establecimiento de estas uniones implica una cinética de asociación y disociación en la que, de forma general, cuanto mayor es la homología entre las secuencias y mayor es la longitud de las mismas mayor es la estabilidad de las uniones. Esta estabilidad depende a su vez del porcentaje relativo de uniones G-C y A-T (en un enlace G-C está implicados tres enlaces de hidrógeno, frente a dos en el caso de las uniones A-T) y de otros factores como, entre otros, la temperatura y la concentración de sal en el tampón de hibridación (una temperatura elevada o una concentración baja de sal favorece la disociación de las dobles cadenas). Teniendo en cuenta todos estos parámetros se determina la temperatura de fusión del ADN, también denominada temperatura de desnaturalización o temperatura *melting* (T_m), que se define como la temperatura a la que se produce la disociación del 50 % de las especies bicatenarias. En el caso de oligonucleótidos con una longitud inferior a 18 nucleótidos, la T_m se puede determinar a partir de la siguiente ecuación (Itakura *et al.*, 1984):

$$T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A+T})$$

Cuando la longitud del oligonucleótido está comprendida entre 14-70 nucleótidos, y siempre que el contenido en sodio (Na^+) de la solución de hibridación no exceda de 1M, es conveniente calcular la T_m a partir de la siguiente fórmula (Bolton *et al.*, 1962):

$$T_m = 81,5 - 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{G+C}) - (600/N)$$

donde, N representa el número de nucleótidos que contiene el oligonucleótido. En el caso de oligonucleótidos degenerados, la fracción G+C se calcula en base al oligonucleótido de la mezcla con menor contenido en dicha fracción, por lo que en las posiciones de ambigüedad se considera la presencia de una A o una T. Cuando en la secuencia del oligonucleótido degenerado aparecen bases sustituidas por análogos, tales como la inosina, éstas no se tienen en cuenta (Ohtsuka *et*

et al., 1985). A partir de la T_m se puede decidir la temperatura de hibridación (T_h), teniendo en cuenta que cuanto más nos aproximemos al valor de la T_m , mayor será la especificidad del apareamiento entre las bases del ADN.

Durante la etapa de polimerización se emplea un enzima, la ADN polimerasa de *Thermus* sp. (*Taq*), capaz de polimerizar a una temperatura óptima de 72°C y resistente a 95°C, por lo que no se requiere la adición de enzima después de cada ciclo. El tiempo de polimerización se fija en función del tamaño de los fragmentos que se van a amplificar.

Finalizada la polimerización, las especies bicatenarias se desnaturalizan a 95°C y se inicia un nuevo ciclo de amplificación.

III.2.11.6.2. Diseño de oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primeros)

El diseño de oligonucleótidos sintéticos específicos requiere el conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen o del fragmento de ADN que se pretende localizar, amplificar o secuenciar. No obstante, a partir de la secuencia aminoacídica del péptido codificado por el gen problema se puede diseñar un oligonucleótido sintético degenerado.

Al ser el código genético degenerado, todos los aminoácidos, excepto la metionina y el triptófano, son codificados por más de un codon, por lo que una misma secuencia aminoacídica se corresponde teóricamente con más de una secuencia nucleotídica. El rango de degeneración entre los diferentes aminoácidos es variable, siendo máximo en el caso de los aminoácidos leucina (Leu), serina (Ser) y arginina (Arg) que pueden ser codificados por seis codones diferentes. La degeneración de los restantes codones se produce en la base que ocupa la tercera posición, pudiendo ser la ambigüedad en este punto doble (C/T, A/G), triple (A/C/T) o cuádruple (A/C/G/T).

La primera fase para el diseño de un cebador degenerado consiste en examinar la secuencia aminoacídica y escoger una de las zonas con menos degeneración, por lo que es conveniente evitar aquellas regiones que contengan Leu, Ser y Arg. Una vez escogida la secuencia aminoacídica se deduce la correspondiente secuencia genética a partir del código genético, tratando siempre de disminuir al máximo la ambigüedad, para de este modo poder elevar las condiciones de especificidad de la hibridación. En el caso de los codones con degeneración triple y cuádruple se puede utilizar la base universal inosina en la tercera posición del codon, evitando de este modo la ambigüedad. La inosina forma pares de bases estables con las cuatro bases nitrogenadas convencionales, siendo la fuerza de apareamiento similar en todos los casos (Ohtsuka *et al.*, 1985). Esta alternativa permite disminuir en un tanto por ciento muy elevado la mezcla final de oligonucleótidos, así como fijar con mayor exactitud la temperatura de fusión del ADN, factor de gran importancia para que la hibridación sea lo más específica posible. Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de los cebadores es que las tres bases del extremo 3' del cebador se acoplen perfectamente con la secuencia de ADN de interés, por lo que en el caso de los oligonucleótidos degenerados es aconsejable la utilización de aminoácidos con poca degeneración y no incluir inosina en esta región.

III.2.11.6.3. Modalidades de la técnica de PCR

(1) PCR específico

En esta modalidad los dos cebadores que se emplean, tanto degenerados como específicos, son complementarios al fragmento de ADN a amplificar. En el caso de que la secuencia de ADN a amplificar sea la comprendida entre ambos cebadores, se denomina PCR específico directo, mientras que cuando se amplifican las regiones colidantes a partir de la secuencia conocida, se denomina PCR específico inverso. En el PCR específico directo, el ADN que se emplea como molde para la amplificación no requiere tratamiento especial, pudiendo utilizarse como fuente de ADN incluso el propio microorganismo productor de la proteína. Esta variante de PCR es de una gran utilidad en los primeros estadios de la estrategia de secuenciación de una proteína de la cual solamente se conoce su secuencia aminoacídica. En el PCR específico inverso, el ADN que se emplea como molde se ha de circularizar antes de someterlo al proceso de amplificación.

(2) PCR hemiespecífico

En este tipo de PCR, uno de los cebadores es complementario a la secuencia del fragmento de ADN que se pretende amplificar y el otro pertenece a un vector de características conocidas. El ADN que se emplea como molde para la amplificación se ha de tratar con enzimas de restricción y, posteriormente, ligar en el vector linealizado.

(3) PCR anidado o nested PCR

En esta modalidad se emplea como molde de ADN el producto amplificado previamente en una reacción de PCR específico o hemiespecífico y, como cebadores, una pareja de primers internos con respecto a la posición de los cebadores empleados en la primera reacción de PCR. El PCR anidado (específico o hemiespecífico) permite incrementar la especificidad de las reacciones de amplificación y, por lo tanto, obtener fragmentos de ADN de mayor pureza.

III.2.11.6.4. Reacciones de amplificación del ADN

En las reacciones de amplificación del ADN hay que tener en cuenta, por una parte, los componentes de la mezcla de reacción y la concentración a la que deben ser empleados y, por otra, la duración y la temperatura de las tres etapas de cada ciclo de la reacción de amplificación (desnaturalización, hibridación y polimerización), así como el número de ciclos del proceso completo.

Las reacciones de amplificación (100 µl) realizadas en este trabajo se llevaron a cabo en un termociclador de ADN de "Perkin Elmer" empleando las soluciones y tampones descritos en la sección III.1.5.7. Independientemente de la modalidad de PCR que se fuera a realizar se emplearon 10 µl del tampón concentrado, 6 µl de Cl_2Mg y 2,5 unidades de ADN polimerasa *Taq*. A partir de los dNTP comerciales (100 mM, pH 7,5) se preparó un *stock* con una concentración final de cada dNTP de 1,25 mM, depositándose para ello 10 µl de cada dNTP en un tubo de Eppendorf y añadiendo posteriormente 760 µl de agua desionizada. Los dNTP se emplearon a una concentración final de 0,2 mM y los cebadores a una concentración final de 0,7 µM. En lo que respecta al ADN molde, en cada reacción se emplearon aproximadamente 150-250 ng.

Para cada reacción de amplificación se preparó, en un tubo de PCR de 0,5 ml, la siguiente mezcla:

| | |
|----------------|---------|
| dNTP (1,25 mM) | 16,0 µl |
| Tampón 10x | 10,0 µl |

| | |
|-----------------------------|--------------|
| MgCl ₂ | 6,0 µl |
| Cebadores | 70-80 pmoles |
| ADN molde | 1,0 µl |
| ADN polimerasa <i>Taq</i> * | 0,5 µl |
| H ₂ O destilada | Hasta 100 µl |
| <hr/> | |
| Volumen total | 100,0 µl |

Los tubos se colocaron en el termociclador y antes de iniciar los ciclos de amplificación se sometieron a una temperatura de 97°C durante 2 min. (*) Posteriormente, se adicionó el enzima y, por último, se añadieron dos gotas de aceite mineral para evitar la desecación de la muestra. A continuación se iniciaron las reacciones de amplificación, cuyas condiciones de tiempo y temperatura fueron:

- (1) Etapa de desnaturalización: 94°C durante 1min.
- (2) Etapa de hibridación: 40-55°C durante 30 seg. Las temperaturas más bajas se emplearon cuando se trabajaba con los cebadores degenerados.
- (3) Etapa de polimerización: 72°C durante 10 seg o hasta 3 min, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar.

En cada reacción de amplificación se realizaron un total de 35 ciclos consecutivos.

III.2.11.6.5. Visualización y análisis de los productos de PCR

La visualización y determinación del tamaño molecular de los fragmentos amplificados por PCR se realizó en geles de agarosa, como se describió en la sección III.2.16.2. En las bandas amplificadas hay que tener en cuenta el hecho de que los cebadores pueden ser visibles como una banda de 50 pb, al ser posible la formación de dímeros, o como una banda inferior difusa que representa los cebadores que no han sido utilizados durante la amplificación.

Las reacciones de PCR en las que se visualizó un único fragmento de tamaño molecular adecuado permitieron su secuenciación directa a partir del producto total de PCR; sin embargo, en aquellos casos en los que se visualizó más de un fragmento fue necesario extraer del gel de agarosa el supuesto fragmento positivo, considerado como tal en virtud de su tamaño molecular. En cualquier caso, antes de iniciar la secuenciación de los fragmentos de ADN, las muestras se purificaron para eliminar impurezas, tales como enzimas, sales, nucleótidos libres, agarosa, colorantes, aceites, etc.

III.2.11.7. Extracción de los productos de PCR de los geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se extrajeron de los geles de agarosa empleando el *kit* comercial QIAEX II Gel Extraction de “Qiagen”. La elevada concentración de sales caotrópicas presentes en el tampón QX1 favorece la ruptura de los puentes de hidrógeno establecidos entre los azúcares del polímero de agarosa permitiendo la solubilización del gel. Concomitantemente, la elevada concentración de sales favorece la disociación de las uniones ADN-proteínas establecidas en el fragmento de ADN a extraer del gel. La adsorción del ADN a las partículas de silica del tampón QIAEX II está favorecida por la alta concentración de sales caotrópicas del tampón QX1, así como por el pH del mismo (<7,5). Tras centrifugar, las moléculas de ADN permanecen adsorbidas a las partículas de silica, mientras que en el sobrenadante se encuentran

impurezas tales como agarosa, proteínas, bromuro de etidio y sales, por lo que esta fracción se desecha. Posteriormente, mediante lavados sucesivos con los tampones QX1 y PE, se eliminan los restos de agarosa y de sales, respectivamente.

III.2.11.7.1. Protocolo de extracción de fragmentos de ADN de los geles de agarosa

- (1) Finalizada la electroforesis, el gel se dispuso sobre un transiluminador de luz UV y, con ayuda de un bisturí, se cortó la porción de gel que contenía el fragmento de interés. Una vez determinado su peso (mg), la porción del gel se colocó en un tubo de Eppendorf.
- (2) A continuación, se depositó un volumen (ml) del tampón QX1 equivalente a 3 veces el peso de la porción de gel, en el caso de que los fragmentos de ADN tuvieran un tamaño entre 100 pb y 4 Kb, y equivalente a 6 veces el peso de la porción de gel, para los fragmentos de ADN menores de 100 pb. En el caso de fragmentos mayores de 4 Kb se depositó un volumen (ml) del tampón comercial QX1 equivalente a 3 veces el peso de la porción de gel y un volumen (ml) de agua desionizada equivalente a 2 veces el peso de la porción del gel. Seguidamente, se añadieron 15 μ l del tampón QIAEX II y la muestra se incubó en un baño termostático a 50°C durante 10 min, agitando la mezcla suavemente para mantener el tampón QIAEX II en suspensión.
- (3) Una vez fundida completamente la agarosa, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 30 seg y se desechó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 500 μ l del tampón QX1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg, tras lo que se desechó el sobrenadante.
- (4) El sedimento se lavó 2 veces con 500 μ l del tampón PE y posteriormente se centrifugó bajo las condiciones descritas anteriormente y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se desecó el sedimento a temperatura ambiente durante 25-30 min.
- (5) Para eluir el ADN, la muestra desecada se resuspendió, con ayuda de un *vortex*, en 20 μ l de agua desionizada, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min, en el caso de tratarse de fragmentos de ADN con un tamaño inferior a 4 kb, y a 50°C durante 5 min cuando se trataba de fragmentos con un tamaño entre 4 y 10 kb. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg y el sobrenadante, que contiene los fragmentos de ADN purificados, se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf, que se depositó inmediatamente en un baño con hielo fundente. Finalmente, se llevó a cabo una segunda elución para incrementar la recuperación, aproximadamente en un 10-15%. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.8. Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó empleando unas minicolumnas con gel de sílica del *kit* comercial QIAquick PCR purification de "Qiagen", basado en un principio similar al descrito en la sección anterior y que permite, entre otras especificaciones, eliminar de las muestras los cebadores no incorporados, que de otro modo interferirían en las reacciones de secuenciación posteriores.

III.2.11.8.1. Protocolo de purificación de los productos de PCR

- (1) A la muestra a purificar se le añadió 5 veces su volumen (ml) de tampón PB. La mezcla se

homogeneizó y se trasvasó a una minicolumna acoplada sobre un tubo de 2 ml de capacidad. Tras centrifugarse a 13.000 rpm durante 1 min, se eliminó el líquido del tubo y la minicolumna se acopló de nuevo sobre el tubo.

- (2) A continuación se depositaron 750 μ l del tampón PE en la minicolumna y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. Seguidamente, se eliminó el líquido del tubo y se acopló de nuevo la minicolumna, centrifugándose inmediatamente en las condiciones descritas anteriormente.
- (3) La minicolumna se transfirió a un tubo de Eppendorf y se añadieron 40-50 μ l de agua desionizada. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, tras lo que se eluyó el ADN mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min. El eluato se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf e inmediatamente se conservó a -20°C.

III.2.11.9. Ligamiento de los productos de PCR en el fagémido pBluescript II SK+

El ligamiento de productos de PRC directamente en vectores de clonación linealizados con extremos planos puede resultar infructuoso debido, entre otras causas, a la actividad transferasa terminal de la ADN polimerasa *Taq*. Como consecuencia de dicha actividad se incorpora un dNTP, preferentemente dATP, al extremo 3' del fragmento de PCR, originándose por tanto una protuberancia 3' (Clark, 1988). En la actualidad se dispone de varias técnicas para convertir los extremos protuberantes de los fragmentos de PCR en extremos planos y, de este modo, posibilitar su inserción en el vector de clonación linealizado. Una de estas estrategias consiste en tratar el producto de PCR con el fragmento grande o fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Esta polimerasa es un polipéptido de 109 Kda codificado por el gen *polA*. El fragmento Klenow, de 75 KDa, corresponde a su extremo carboxi-terminal y conserva la actividad polimerásica y la exonucleasa 3'-5'. La actividad exonucleasa 3'-5' permite eliminar la protuberancia 3' mediante la hidrólisis del enlace fosfodiéster del dNTP que se incorporó en este extremo por la actividad de la ADN polimerasa *Taq*. Originariamente, el fragmento Klenow se generaba por el tratamiento de la ADN polimerasa I con subtilisina (Jacobsen, 1974). En la actualidad, se obtiene este fragmento por clonación del gen *polA* modificado genéticamente para producir la ADN polimerasa I sin los 323 residuos aminoácidos de su extremo N-terminal (Joyce y Grindley, 1983).

III.2.11.9.1. Tratamiento de los productos de PCR con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I

El fragmento de PCR se trató con el fragmento Klenow según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), como se indica a continuación:

- (1) Para cada tratamiento se preparó en un tubo de Eppendorf la siguiente mezcla de reacción:

| | |
|------------------------------|--------------|
| ADN (producto de PCR) | 10,0 μ l |
| Fragmento Klenow ("Promega") | 1,0 μ l |
| Tampón 10x ("Promega") | 2,5 μ l |
| dNTP (2 mM) ("Pharmacia") | 1,0 μ l |
| Agua desionizada | 10,5 μ l |
| <hr/> | |
| Volumen total | 25,0 μ l |

- (2) La mezcla se agitó por inversión del tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la actuación del enzima.
- (3) A continuación, la muestra se mantuvo en un baño termostático a 75°C durante 20 min para inactivar el enzima e inmediatamente después se depositó en un baño de hielo fundente.
- (4) La muestra se concentró, como se describió en la sección III.2.11.4.2.2, hasta un volumen final de 13 µl y se procedió a su ligación en el vector pBluescript.

III.2.11.9.2. Ligamiento de los productos de PCR tratados con el fragmento Klenow en el fagémido pBluescript II SK+

Las reacciones de ligamiento se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), como se indica a continuación:

- (1) El tubo de Eppendorf que contenía el ADN a insertar (13 µl) se depositó en un baño de hielo fundente y se añadieron las siguientes soluciones:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Vector linealizado (0,3 µg) | 4,0 µl |
| Tampón T4 ADN ligasa 10x ("Promega") | 2,0 µl |
| T4 ADN ligasa ("Promega") | 1,0 µl |
| <hr/> | |
| Volumen de reacción | 20,0 µl |

- (2) La mezcla se agitó suavemente por inversión del tubo y se incubó en un baño termostático a 15°C durante 16 horas. Finalizada la incubación, la muestra se conservó a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.10. Técnica de secuenciación del ADN

La secuenciación es la técnica más poderosa empleada para la caracterización de los ácidos nucleicos. Una vez conocida la secuencia nucleotídica se dispone, en principio, de todas las claves para estudiar el papel biológico de ese fragmento de material genético. Los procedimientos básicos de secuenciación son el método químico de Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1977) y el método enzimático de Sanger o método didesoxi de finalización o terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977), ambos basados en la producción de fragmentos de ADN de diferente longitud que empiezan en un punto fijo y terminan en nucleótidos específicos. Los fragmentos de ADN se producen por acción química o mediante copia enzimática a partir de un fragmento de ADN de cadena sencilla. Finalizadas las reacciones de secuenciación, los fragmentos de ADN obtenidos se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida y, posteriormente, se obtiene la correspondiente autorradiografía que permite la determinación directa de la secuencia nucleotídica mediante la lectura de la posición de las bandas.

Los fragmentos a secuenciar en este trabajo se amplificaron por PCR hemiespecífico, tanto directo como anidado, previa inserción en el vector pBluescript convenientemente preparado para ello. En cualquier caso, la pareja de cebadores utilizada incluía uno específico del vector y biotinizado en su extremo 5'. Las reacciones de PCR que permitieron la visualización de un único fragmento de tamaño molecular adecuado hicieron posible su secuenciación directa a partir del producto total de PCR; sin embargo, en aquellos casos en los que se visualizó más de un fragmento fue necesario extraer previamente del gel de agarosa el supuesto fragmento positivo

(en base al tamaño molecular calculado). En cualquier caso, antes de ser secuenciadas, las muestras se purificaron para eliminar las impurezas, tales como enzimas, sales, nucleótidos libres, agarosa, colorantes, aceites, etc. como se describió en la sección III.2.11.8.

III.2.11.10.1. Fundamento de la técnica de secuenciación del ADN

Las reacciones de secuenciación de este trabajo se realizaron mediante el *kit* de secuenciación Sequenase Version 2.0 de “USB”, basado en el método enzimático de Sanger. Esta metodología se basa en la capacidad de los 2'-3' didesoxinucleótidos (ddNTP) de actuar como finalizadores de cadena, ya que al no poseer el grupo 3' hidroxilo no pueden formar el enlace fosfodiéster necesario para la incorporación del siguiente nucleótido. De esta manera, cuando la polimerasa introduce un didesoxinucleótido en la cadena que se está sintetizando bloquea su elongación.

La síntesis de ADN se realiza en dos etapas: en la primera etapa tienen lugar las reacciones de hibridación del ADN con los cebadores de secuenciación, la reacción de elongación y el marcado radiactivo de la cadena de ADN que se está sintetizando y en la segunda etapa se realizan las reacciones de finalización con los diferentes didesoxinucleótidos.

En la primera etapa (fase de hibridación, elongación y marcado radiactivo) se dispone una reacción que contiene una cadena sencilla de ADN que actúa como molde, y que corresponde al fragmento de ADN que se va a secuenciar, un cebador de aproximadamente 15-25 nucleótidos complementarios al extremo 5' de la cadena molde, los cuatro desoxinucleótidos (al menos uno de ellos marcado radiactivamente) y la ADN polimerasa T7 modificada por ingeniería genética (“Sequenasa 2.0”). La ADN polimerasa T7 incorpora preferentemente los didesoxinucleótidos y tiene una capacidad de polimerización superior al fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*, pero mantiene una cierta actividad exonucleasa. Sin embargo, en la ADN polimerasa T7 Sequenasa 2.0, se ha eliminado prácticamente esta actividad exonucleasa por ingeniería genética.

En la segunda etapa (fase de terminación), se añade una alícuota de la reacción anterior a cada una de las mezclas de terminación (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) y, de esta manera, se obtiene en cada reacción un conjunto de subcadenas que terminan en los puntos en los que se incorporó el ddNTP que se usó como inhibidor de la elongación; es decir, la posición de cada desoxinucleótido en la cadena molde está representada por la longitud del fragmento que ha incorporado el didesoxinucleótido correspondiente.

La reacción de secuenciación ha de llevarse a cabo en dos etapas ya que la sequenase 2.0 tiene mayor afinidad por los didesoxinucleótidos (ddNTP) que por los desoxinucleótidos (dNTP), de tal modo que si en la mezcla inicial estuvieran presentes ambos, los fragmentos sintetizados serían muy cortos y sólo se podrían leer muy pocas bases próximas al cebador.

III.2.11.10.2. Obtención y preparación del ADN de cadena sencilla

Para la obtención y preparación del ADN de cadena sencilla a partir de los productos de PCR purificados, se empleó el *kit* Dynabeads M-280 Streptavidin de “Dynal”, que permite obtener mejores resultados que cuando se desnaturaliza el ADN por calor y que, además, posibilita la recuperación y secuenciación simultánea de las dos cadenas del ADN, con lo que se puede definir mejor y con un margen de error menor la secuencia exacta del fragmento a estudiar. Las *Dynabeads* son unas partículas de poliestireno con moléculas de estreptavidina unidas

covalentemente a su superficie y con un átomo de hierro en su interior que les confiere capacidad magnetizante. El fragmento de PCR queda inmovilizado en las partículas de poliestireno, debido a la afinidad existente entre las moléculas de biotina de su extremo 5' y las moléculas de estreptavidina conjugadas en el soporte sólido. A continuación, el ADN se desnaturaliza con una solución de NaOH 0,1N y, posteriormente, mediante la utilización de un separador magnético, se separan las dos cadenas sencillas de ADN: una de ellas biotinizada y la otra sin biotinizar, que en adelante se denominarán hebra positiva y hebra negativa, respectivamente.

El procedimiento empleado se describe a continuación:

(1) Prelavado de las *Dynabeads*

- Se depositaron 20 μ l (200 μ g) de las *Dynabeads* en un tubo de Eppendorf, que se colocó posteriormente en el separador magnético para eliminar el sobrenadante.
- Las *Dynabeads* se resuspendieron cuidadosamente con ayuda de una pipeta automática en 20 μ l del tampón B&W 1x. A continuación, se colocó de nuevo el tubo en el separador magnético para eliminar el sobrenadante.
- Finalmente, las *Dynabeads* se resuspendieron en 40 μ l del tampón B&W 2x.

(2) Inmovilización del producto PCR

- Se depositaron 40 μ l del producto de PCR purificado en el tubo de Eppendorf que contenía los 40 μ l del tampón B&W 2x con las *Dynabeads* prelavadas, y se mezcló suavemente con una pipeta automática.
- La solución se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, en el caso de que el fragmento a secuenciar tuviera un tamaño inferior a 1 kb, o en un baño termostático a 43°C durante 30 min cuando el tamaño del fragmento era superior a 1 kb. En ambos casos, las *Dynabeads* se han de mantener en suspensión, para que la cadena biotinizada del producto de PCR se adhiera a la estreptavidina conjugada al soporte sólido, por lo que el tubo se agitó suavemente por inversión cada 3-5 min.

(3) Lavado y desnaturalización del ADN de doble cadena

- El tubo de Eppendorf que contenía el producto de PCR inmovilizado se colocó en el separador magnético y se eliminó el sobrenadante.
- El sedimento se lavó con 40 μ l del tampón B&W 1x y, posteriormente, se colocó en el separador para retirar el sobrenadante, asegurándose de que se eliminaba por completo.
- Finalmente, la muestra se resuspendió en 8 μ l de una solución desnaturalizante de NaOH 0,1 M, recién preparada y mantenida en hielo, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, en el caso de que el fragmento a secuenciar tuviera un tamaño inferior a 1 Kb, o durante 5 min, cuando el tamaño era mayor a 1 Kb.

(4) Separación y recuperación de las dos cadenas complementarias de ADN

- El tubo de Eppendorf con el ADN desnaturalizado se colocó en el separador magnético para separar las dos cadenas complementarias de ADN.
- El sobrenadante (8 μ l), que contiene la cadena no biotinizada (hebra negativa), se trasvasó cuidadosamente, con ayuda de una pipeta automática, a un nuevo tubo de Eppendorf e inmediatamente después se depositó en un baño de hielo fundente.
- El sedimento, que contiene las *Dynabeads* con la cadena complementaria biotinizada (hebra positiva), se lavó con 50 μ l de la solución de NaOH 0,1 M y, posteriormente, el tubo de

Eppendorf se colocó en el separador magnético para eliminar el sobrenadante. A continuación, se efectuó un segundo lavado con 40 μ l del tampón B&W 1x del modo descrito anteriormente. Finalmente, el sedimento (hebra positiva) se resuspendió en 50 μ l del tampón TE y se conservó a 4°C hasta su empleo. El volumen de la solución en la que se encuentra el ADN de cadena sencilla que se va a secuenciar ha de ajustarse a un volumen final de 7 μ l, para lo cual el tubo de Eppendorf que contenía los 50 μ l del tampón TE con la hebra positiva se dispuso en el separador magnético y, tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 7 μ l de agua desionizada.

- El sobrenadante (8 μ l), que contiene la cadena complementaria no biotinizada (hebra negativa), se neutralizó con 4 μ l de HCl 0,2M y con 1 μ l de Tris HCl 1M, pH 7,5. Es importante emplear durante todo el proceso de neutralización la misma pipeta automática para asegurarse que las cantidades requeridas se dispensan con la máxima precisión. Seguidamente, el ADN se precipitó, para lo cual se añadió un 10% (1,3 μ l) de una solución de acetato sódico 3N, pH 7,0 y 3 volúmenes (42,9 μ l) de alcohol etílico a -20°C. Tras agitarse suavemente por inversión, el tubo se mantuvo a -85°C durante 1 hora, centrifugándose posteriormente a 13.000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y se desechó, mientras que el sedimento se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 70% (v/v) en agua desionizada y se desecó a vacío durante 5 minutos. La muestra desecada se resuspendió en 7 μ l de agua desionizada y se conservó a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.10.3. Reacciones de hibridación del ADN con los cebadores de secuenciación

En las reacciones de secuenciación de la hebra positiva de ADN se utiliza el cebador específico del fragmento a secuenciar (el mismo que se utilizó para su amplificación por PCR o uno interno), mientras que para secuenciar la hebra negativa se emplea el cebador específico del vector (el mismo que se utilizó para la amplificación del fragmento por PCR). Los cebadores se emplearon a una concentración final equimolar de 0,05 μ M.

El procedimiento empleado se indica a continuación:

- (1) Para la secuenciación de cada fragmento de ADN se preparó la siguiente mezcla de reacción en un tubo de Eppendorf:

| | |
|-----------------------------------------|-------------|
| ADN molde (cadena sencilla) | 7,0 μ l |
| Tampón sequenasa de reacción 5x ("USB") | 2,0 μ l |
| Cebador (0,5 μ M) | 1,0 μ l |
| <hr/> | |
| Volumen total | 10 μ l |

- (2) Una vez homogeneizada la mezcla suavemente con ayuda de una pipeta automática, se incubó en un baño termostático a 65°C durante 2 min. A continuación, se depositó en una cubeta con agua precalentada a 65°C y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20-30 min para que descendiera lentamente la temperatura de la muestra hasta aproximadamente 32°C. Inmediatamente después, las muestras se depositaron en un baño de hielo fundente.

III.2.11.10.4. Reacción de elongación y marcado radiactivo con S₃₅

Una vez establecido el apareamiento entre los cebadores de secuenciación y la secuencia de ADN complementaria, se procede a la reacción de elongación y marcado radiactivo de la cadena de ADN que se está sintetizando. Antes de preparar la reacción de elongación y marcado

radiactivo, se precalentaron las mezclas de terminación a 37°C, para lo cual se depositaron 2,5 µl de cada una de las soluciones con los didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) en cuatro tubos de Eppendorf y se sumergieron en un baño termostático a 37°C.

Para preparar la reacción de elongación y marcado radiactivo se procedió del siguiente modo:

- (1) De la solución comercial de dNTP 5x ("USB") se depositaron 4 µl en un tubo de Eppendorf y se mezclaron con 16 µl de agua desionizada. La mezcla de dNTP 1x se depositó en hielo fundente. Asimismo, se depositó 1 µl del enzima ADN polimerasa T7 en un tubo de Eppendorf, se le añadieron 7 µl del tampón de disolución del enzima e inmediatamente se depositó en hielo fundente.
- (2) En el tubo de Eppendorf que contenía el ADN molde hibridado con el cebador correspondiente y que se había mantenido en hielo fundente se preparó la siguiente reacción mezclando los reactivos que se citan a continuación:

| | |
|-------------------------------------------------------|--------|
| DTT 0,1M ("USB") | 1 µl |
| Mezcla de dNTP 1x | 2 µl |
| Isótopo radiactivo $\alpha^{35}\text{S}$ dATP ("ALS") | 0,5 µl |
| ADN polimerasa T7 (1:1) | 2 µl |

- (3) La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 min para permitir la actuación de la T4 ADN polimerasa y por tanto la elongación de la cadena de ADN.

III.2.11.10.5. Reacciones de terminación con didesoxinucleótidos

La síntesis de ADN se finaliza en cuatro reacciones de terminación, empleando en cada una de ellas uno de los didesoxinucleótidos de terminación de cadena (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Para finalizar la elongación de los fragmentos que se están sintetizando se prepararon las reacciones de terminación con los ddNTP del siguiente modo:

- (1) Se depositaron 3,5 µl de la reacción de elongación y marcado en cada uno de los tubos de Eppendorf precalentados a 37°C que contenían las mezclas de terminación (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) y, posteriormente, se continuó la incubación de las reacciones de terminación a 37°C durante otros 5 min.
- (2) Finalmente, se añadieron 4 µl de la solución de parada a cada una de las cuatro reacciones de terminación.
- (3) Las muestras así preparadas pueden conservarse durante una semana a -20°C hasta su empleo.

III.2.11.10.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

III.2.11.10.6.1. Preparación de los geles de secuenciación

En presencia de radicales libres, que son aportados por el persulfato amónico y estabilizados por el TEMED, los monómeros de acrilamida se polimerizan en largas cadenas. Posteriormente, se establecen enlaces cruzados entre ellas, gracias a la N, N'-metilén-bisacrilamida, con la consiguiente formación de la matriz del gel, cuya porosidad está determinada por la longitud de las cadenas de acrilamida y por el número de enlaces cruzados.

Se procedió del siguiente modo:

- (1) En el momento de la preparación de los geles de secuenciación se añadieron 160 µl de SPA

y 90 µl de TEMED a 80 ml de la solución de acrilamida (6% v/v) con urea (6M). La solución gelificante recién preparada se mantuvo en un vaso de precipitado inmerso en hielo fundente hasta su empleo.

- (2) Los cristales de secuenciación se lavaron profusamente con agua jabonosa y, posteriormente con etanol al 96%. Se dejaron secar y el más pequeño se impregnó con la solución repelente de silicona "Sigmacote SL-2"; una vez evaporado el diluyente (heptano) se repitió el tratamiento, para garantizar que el gel quedara unido al cristal grande después de la carrera electroforética. A continuación, se acoplaron ambos cristales intercalándose en los laterales dos láminas separadoras de 0,35 mm, se colocó cinta adhesiva a su alrededor para evitar pérdidas de la solución gelificante y se dispusieron pinzas en los laterales que ejercieran presión y asegurasen la correcta homogeneización del gel.
- (3) Se cargaron aproximadamente 80 ml de la solución gelificante en una jeringa y se depositaron en el espacio entre ambos cristales (0,4 mm), que se dispusieron ligeramente inclinados para evitar la formación de burbujas y facilitar la operación de llenado. Inmediatamente después, se colocaron en la parte superior del cristal pequeño dos peines separadores invertidos que se introdujeron 50 cm para marcar el frente electroforético y se cubrió con una lámina de plástico adherente para evitar una deshidratación excesiva del gel. El gel de secuenciación se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 2-20 horas.

III.2.11.10.6.2. Montaje del armazón de secuenciación

- (1) En primer lugar se retiró la lámina de plástico, las pinzas, los peines separadores y la cinta adhesiva de la parte inferior de los cristales y el frente se lavó profusamente con agua destilada. Los cristales con el gel se dispusieron en la cubeta de secuenciación y se añadió el tampón de electroforesis TBE 1x. A continuación, se lavó el frente superior con TBE para eliminar los cristales de urea y se dispusieron los peines con los dientes ligeramente introducidos en el frente, lo que permitió disponer de 48 pocillos para cargar las muestras.
- (2) Seguidamente, el armazón electroforético se conectó a la fuente de alto voltaje y se precalentó el gel a 75 w hasta que alcanzó una temperatura de 50°C (45-60 min), la cual se detectó mediante un sensor adherido a uno de los cristales.

III.2.11.10.6.3. Condiciones de la carrera electroforética

- (1) Las muestras a secuenciar se calentaron en un baño termostatado a 92°C durante 2 min, inmediatamente después se sumergieron en hielo fundente y se cargaron en el gel en el orden ACGT, a razón de 2,5 µl por pocillo. Es conveniente no utilizar los pocillos laterales, para evitar el efecto curvatura del gel.
- (2) Se aplicó un campo eléctrico de 65 W y voltaje variable (1700-2000 V) que permitió el mantenimiento de una temperatura óptima de secuenciación de 50°C. Se realizó una carrera corta de 1 hora y media, hasta que el colorante azul (azul de bromofenol) abandonó el gel, para leer la secuencia próxima al cebador (aproximadamente 120-130 pb) y una carrera larga de 4 horas para secuenciar hasta 300 pb.

III.2.11.10.7. Procesado de los geles de secuenciación y autorradiografía

- (1) Finalizada la electroforesis se separaron los cristales, quedando el gel de secuenciación adherido al cristal grande. El gel se sumergió en la solución de lavado y fijación y se mantuvo aproximadamente 20 min. Se sacó el cristal de la solución y se depositaron encima del gel dos láminas de papel Whatman n° 1. Tras ejercer una ligera presión sobre las láminas, éstas se retiraron lenta y cuidadosamente, quedando el gel de secuenciación adherido a una de ellas. El gel se cubrió con una lámina de plástico y se deshidrató a vacío en un desecador horizontal a 80°C durante 1 hora.
- (2) Una vez desecado el gel, se retiró la lámina de plástico y se autorradiografió en un cartucho de amplificación de señal radiactiva con una película de máxima eficacia para la radiación emitida por el S³⁵. El periodo de exposición de la película fue variable, generalmente 24-72 horas.
- (3) Finalizada la exposición, la autorradiografía se reveló en un equipo automático y se procedió a la lectura directa y al análisis de la secuencia nucleotídica.

III.2.11.11. Análisis informático de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

El análisis informático de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas se realizó en un ordenador PC de IBM, con los paquetes informáticos PCGene (versión 6,8; IntelliGenetics, Inc., Mountain View, California) y Genetics Computer Group (versión 8; University of Wisconsin, Madison). Los programas empleados del paquete PCGene fueron PHYSCHEM, SOAP (Klein *et al.*, 1985 y Kyte y Doolite, 1982), HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984) y PALIGN. Con el programa PHYSCHEM se calculó el tamaño molecular, la composición aminoacídica, la carga neta (a pH 7,0) y el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. Mediante el programa SOAP se determinó el índice GRAVY o valor promedio de hidropaticidad de las proteínas (del inglés, *Grand Average Hydropathy Value*), que se define como la suma de los valores hidropáticos de cada aminoácido dividido por el total de aminoácidos de la secuencia objeto de estudio (el valor obtenido se multiplica por 10) (Kyte y Doolite, 1982). Asimismo, mediante este programa, se clasificaron las proteínas de membrana en periféricas o integrales y, en este último caso, se predijo la existencia de segmentos transmembrana (Klein *et al.*, 1985). El programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984) se empleó para predecir el número de posibles hélices α transmembrana (PTHs). El programa PALIGN se utilizó para realizar los alineamientos de pares de secuencias aminoacídicas y establecer los porcentajes de identidad.

Los programas empleados del paquete Genetics Computer Group fueron FASTA, MAP, PILEUP, ECLUSTALW, PRETTYPLOT y PRETTYBOX. Mediante el programa FASTA se establecieron las similitudes entre las diversas secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de las proteínas caracterizadas en este trabajo con las de otras de los bancos de datos SWISS-PROT, SWISS-NEW, TREMBLNEW, PDB-PROTEIN y PIR. El programa MAP se utilizó para establecer los mapas de restricción de las secuencias nucleotídicas. Los restantes programas se emplearon para realizar los alineamientos y establecer las homologías existentes entre las secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas e hipotéticas proteínas de inmunidad caracterizadas en este trabajo y las de otras bacteriocinas y proteínas de inmunidad descritas hasta el momento.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo se registraron en el banco de datos

GENBANK mediante la dirección electrónica gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov.

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

IV.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO SÓLIDO A PARTIR DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

La flora láctica presente en 8 embutidos crudos curados artesanales (chorizos caseros), elaborados sin adición de cultivos iniciadores en diversas localidades de la geografía española, se aisló en placas con agar MRS que se incubaron a 32°C bajo condiciones de microaerofilia. De las colonias desarrolladas se preseleccionaron al azar 96 de cada embutido, todas ellas de pequeño tamaño (1-2 mm), de forma convexa, de color blanco y con bordes lisos.

La actividad antimicrobiana en medio sólido de las colonias preseleccionadas se evaluó, mediante el método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura, empleando como microorganismos indicadores *P. acidilactici* 347, *Lb. sake* 148 y *Ls. monocytogenes* ScottA (sección III.2.3.1). De las 96 colonias preseleccionadas de cada embutido, se seleccionaron aquellas que produjeron halos de inhibición nítidos de más de 4 mm de diámetro frente a, al menos, uno de los tres microorganismos indicadores. Posteriormente, se determinaron su morfología y sus afinidades tintoriales, mediante la tinción de Gram, así como su actividad catalásica. El número y la morfología de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana por siembra en picadura seleccionadas de cada embutido, así como la denominación y procedencia de los mismos, se muestra en la Tabla IV.1. Las 46 cepas seleccionadas resultaron ser Gram-positivas y catalasa-negativas, si bien, constituyeron un grupo de morfología variable.

Del embutido A, procedente de Cáceres, se seleccionaron 6 cepas, 4 de morfología cocoide y 2 bacilos. De los 4 cocos, las cepas A172 y A188 produjeron halos de inhibición muy nítidos, con diámetros de 6 y 9 mm, respectivamente, frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, mientras que las cepas A1 y A130 mostraron halos de inhibición menores y no tan nítidos frente a este microorganismo indicador. De las 2 cepas con morfología bacilar, una de ellas inhibió a los tres microorganismos indicadores, si bien el diámetro de los halos fue tan solo de 4-5 mm, y la otra únicamente inhibió a *P. acidilactici* 347.

En el embutido AA, originario de Cáceres, se detectaron 8 colonias con actividad antimicrobiana, 4 de morfología cocoide y 4 bacilos. De los 4 cocos, la cepa AA13 produjo los halos de inhibición más nítidos, con un diámetro de 8-10 mm, frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, pero no inhibió a ninguna de las dos bacterias lácticas empleadas como indicadores. De los 4 bacilos, la cepa AA24 destacó por producir halos de inhibición muy nítidos, con diámetros de 7-10 mm, frente a los tres microorganismos indicadores.

En el embutido B, procedente de Segovia, se detectó una colonia de morfología bacilar que produjo halos de inhibición de 5 mm de diámetro frente a *Ls. monocytogenes* ScottA y de 4 mm frente a *P. acidilactici* 347.

Las 5 cepas seleccionadas del embutido G, originario de Sevilla, presentaron morfología cocoide. La cepa G18 destacó por el tamaño y nitidez de los halos que produjo frente a *Lb. sake* 148 y *P. acidilactici* 347, aproximadamente de 10 y 12 mm, respectivamente; sin embargo, los halos que produjo frente a *Ls. monocytogenes* ScottA fueron algo menores. Las cepas G16 y G33 sólo fueron activas frente a *Ls. monocytogenes* ScottA produciendo halos de inhibición de

Tabla IV.1. Bacterias lácticas con actividad antimicrobiana aisladas de embutidos crudos curados artesanales de diversas localidades españolas^a

| Embutido | Procedencia | Nº de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana por: | | | | | |
|-----------|-------------|------------------------------------------------------------|---------|-----------|------------------|---------|-----------|
| | | Siembra por picadura | | | Difusión en agar | | |
| | | Cocos | Bacilos | Total | Cocos | Bacilos | Total |
| A | Cáceres | 4 | 2 | 6 | 1 | - | 1 |
| AA | Cáceres | 4 | 4 | 8 | 1 | 1 | 2 |
| B | Segovia | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 |
| G | Sevilla | 5 | - | 5 | 2 | - | 2 |
| P | León | 3 | 3 | 6 | 3 | - | 3 |
| S | Burgos | 1 | 6 | 7 | - | 1 | 1 |
| T | Burgos | 3 | - | 3 | 1 | - | 1 |
| X | León | 8 | 2 | 10 | 1 | - | 1 |
| | | Total | | 46 | Total | | 12 |

^aDe cada embutido se preseleccionaron al azar 96 colonias y se evaluó su actividad antimicrobiana mediante el método de inhibición por siembra en picadura (sección III.2.3.1); posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de las 46 colonias seleccionadas mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2). En ambos casos, los microorganismos indicadores empleados fueron *Lb. sake* 148, *P. acidilactici* 347 y *Ls. monocytogenes* ScottA.

7 y 8 mm de diámetro, respectivamente.

De las 6 cepas seleccionadas del embutido P, elaborado en León, se identificaron 3 cocos y 3 bacilos. Las cepas de morfología cocoide P13, P20 y P21 mostraron actividad antimicrobiana frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, produciendo halos de 8-10 mm. Los bacilos sólo inhibieron débilmente a las 2 bacterias lácticas empleadas como microorganismos indicadores.

Del embutido S, producido en Burgos, se seleccionaron 7 cepas, 1 de morfología cocoide y 6 bacilos. La cepa cocoide inhibió solamente a *P. acidilactici* 347, mientras que los 6 bacilos fueron activos frente a *P. acidilactici* 347 y *Ls. monocytogenes* ScottA, si bien, la cepa S124 fue la que produjo los mayores halos de inhibición.

Las 3 cepas seleccionadas del embutido T, originario de Burgos, presentaron morfología cocoide e inhibieron el crecimiento de *Ls. monocytogenes* ScottA. La cepa T136 produjo además halos de inhibición nítidos, de 10 mm de diámetro, frente a *Lb. sake* 148.

En el embutido X, procedente de León, se identificaron 10 cepas con actividad antimicrobiana, 8 de morfología cocoide y 2 bacilos. De los 8 cocos, la cepa X13 produjo los mayores halos de inhibición frente a *Ls. monocytogenes* ScottA. Los 2 bacilos sólo inhibieron débilmente a las bacterias lácticas empleadas como indicadores.

IV.2. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES EN MEDIO LÍQUIDO

Las 46 bacterias lácticas seleccionadas por presentar actividad antimicrobiana en medio sólido se cultivaron en caldo MRS a 32°C durante 16 h y, posteriormente, se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes libres de células neutralizados y esterilizados por filtración y sobrenadantes concentrados 20 veces por liofilización para evaluar su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2), frente a los mismos indicadores que se emplearon para detectar la actividad antimicrobiana en medio sólido. En la Tabla IV.1 se observa que de las 46 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en medio sólido, solamente 12 (9 de morfología cocoide y 3 de morfología bacilar) mostraron actividad inhibidora en medio líquido.

Los resultados de la actividad antimicrobiana exocelular de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de estas 12 cepas frente a *Lb. sake* 148, *P. acidilactici* 347 y *Ls. monocytogenes* ScottA se muestran en la Tabla IV.2. Las 9 cepas de morfología cocoide inhibieron el desarrollo de *Ls. monocytogenes* ScottA, tanto en el sobrenadante como en el sobrenadante concentrado, pero carecieron de actividad antimicrobiana detectable frente a las bacterias lácticas empleadas como indicadores, a excepción de las cepas G18 y T136. La cepa G18 resultó ser la menos activa frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, pero, por el contrario, fue la única que inhibió a *P. acidilactici* 347 y, junto con la cepa T136, a *Lb. sake* 148. En cuanto a las cepas de morfología bacilar, la actividad antimicrobiana de la cepa B18 únicamente se detectó en su sobrenadante concentrado frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, al igual que en el caso de la cepa S124, si bien ésta mostró además una fuerte inhibición del desarrollo de *P. acidilactici* 347, detectable tanto en su sobrenadante como en su sobrenadante concentrado. El bacilo AA24

Tabla IV.2. Actividad antimicrobiana exocelular de las 12 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Lactobacillus sake* 148, *Pediococcus acidilactici* 347 y *Listeria monocytogenes* ScottA^a

| | | | COCOS | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------|---------------------|-------------|------|-------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| | | | <u>A172</u> | | <u>AA13</u> | | <u>G16</u> | | <u>G18</u> | | <u>P13</u> | | <u>P20</u> | |
| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 148 | FVM | - | - | - | - | - | - | 13,7 | 15,0 | - | - | - | - |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | 347 | FVM | - | - | - | - | - | - | 19,3 | 19,4 | - | - | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 15,3 | 19,0 | 11,5 | 14,6 | 11,3 | 15,4 | 7,0 | 8,4 | 12,0 | 15,6 | 9,3 | 10,5 |

| | | | COCOS | | | | | | BACILOS | | | | | |
|---------------------------------|--------|---------------------|------------|------|-------------|------|------------|------|-------------|------|------------|-----|-------------|------|
| | | | <u>P21</u> | | <u>T136</u> | | <u>X13</u> | | <u>AA24</u> | | <u>B18</u> | | <u>S124</u> | |
| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 148 | FVM | - | - | 12,2 | 13,6 | - | - | 13,6 | 16,0 | - | - | - | - |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | 347 | FVM | - | - | - | - | - | - | 17,3 | 20,2 | - | - | 14,6 | 17,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 10,0 | 12,3 | 12,0 | 16,0 | 13,2 | 17,6 | 7,0 | 8,3 | - | 9,6 | - | 7,2 |

^aActividad antimicrobiana determinada mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2) y expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm. SB, sobrenadante libre de células; SC, sobrenadante libre de células concentrado veinte veces; -, inhibición no detectada empleando 50 µl de SB o SC.

^bAbreviaturas como en la Tabla III.1.

inhibió el desarrollo de los tres microorganismos indicadores, tanto con su sobrenadante como con su sobrenadante concentrado, mostrando una mayor actividad antimicrobiana frente a *P. acidilactici* 347.

Los resultados obtenidos indican que las sustancias antimicrobianas responsables de la actividad inhibidora de las 12 bacterias lácticas seleccionadas se excretan al medio exocelular y que dicha actividad es fácilmente detectada en sus sobrenadantes y/o sobrenadantes concentrados. Por otra parte, estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana exocelular no se debe a la deplección de nutrientes del medio, ni a un descenso del pH, ni a la presencia de bacteriófagos o de peróxido de hidrógeno.

IV.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS 12 BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES

Con el objeto de disponer de más información sobre el espectro de acción antimicrobiana de las 12 bacterias lácticas seleccionadas, se evaluó la actividad inhibidora de sus sobrenadantes y sobrenadantes concentrados, mediante el método de difusión en agar, frente a diversos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos de interés en la industria alimentaria. Los resultados de inhibición obtenidos frente a las 20 bacterias Gram-positivas empleadas como microorganismos indicadores se muestran en la Tabla IV.3.

Las cepas de morfología cocoide A172 y X13 mostraron un amplio y potente espectro de acción frente a la práctica totalidad de las bacterias empleadas como indicadores, incluidos microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias como *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum*, *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*. Asimismo, estas cepas ejercieron una fuerte inhibición del desarrollo de otras bacterias lácticas y de microorganismos potencialmente alterantes de los alimentos como *Propionibacterium* spp. La cepa P20 presentó un espectro de acción similar al de las cepas A172 y X13, si bien los halos de inhibición detectados fueron menores; concretamente, en lo que respecta a la inhibición de las otras bacterias lácticas la actividad antimicrobiana se detectó solamente en su sobrenadante concentrado. Las cepas AA13, P13, P21 y T136 mostraron una gran inhibición del desarrollo de la mayoría de los microorganismos alterantes y patógenos analizados. A este respecto, es interesante destacar que las cepas T136 y P13 produjeron los mayores halos de inhibición, tanto con sus sobrenadantes como con sus sobrenadante concentrados, frente a las 5 cepas de la especie patógena *Ls. monocytogenes*. A parte de su potente actividad anti-*Listeria*, estas cepas inhibieron el desarrollo de las 2 cepas analizadas de la especie patógena *St. aureus* y de las 2 especies del género *Propionibacterium*. Por otra parte, aunque estas cepas inhibieron el desarrollo de las especies patógenas *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*, en la mayoría de los casos la inhibición se detectó únicamente en los sobrenadantes concentrados. La marcada sensibilidad de los microorganismos alterantes y patógenos a los sobrenadantes de la cepa T136 contrasta con la resistencia, o la escasa sensibilidad, que presentaron la mayoría de las bacterias lácticas analizadas. La cepa G16 mostró un espectro antimicrobiano similar, aunque no inhibió el desarrollo de *Cl. perfringens* CECT376 ni de *Cl. botulinum* CECT551.

Tabla IV.3. Actividad antimicrobiana exocelular de las 12 bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria^a

| | | | COCOS | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------|---------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | A172 | | AA13 | | G16 | | G18 | | P13 | | P20 | |
| | | | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 334 | ATCC | - | - | - | - | - | - | 18,2 | 19,4 | - | - | - | - |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9338 | CECT | 19,3 | 23,2 | 12,1 | 14,1 | 15,0 | 17,4 | 7,5 | 9,0 | 14,7 | 19,4 | - | 12,0 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1193 | NCDO | - | 10,3 | - | - | - | - | 8,0 | 7,4 | - | - | - | 8,3 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 2714 | NCFB | 15,0 | 17,8 | 10,0 | 13,3 | 8,0 | 12,0 | 12,0 | 11,0 | 10,7 | 15,4 | - | 7,0 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB61 | TNO | 17,0 | 23,5 | - | 9,0 | 11,0 | 15,0 | 17,7 | 18,5 | 8,3 | 13,0 | - | 7,9 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB63 | TNO | 13,5 | 19,3 | 9,6 | 14,4 | - | 13,0 | 10,5 | 12,0 | 9,7 | 15,3 | - | 7,5 |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | DB1275 | TNO | - | - | - | - | - | - | 11,2 | 12,4 | - | - | - | - |
| <i>Lactococcus cremoris</i> | CNRZ117 | INRA | - | - | - | - | - | - | 13,0 | 12,0 | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | EF | TNO | 15,0 | 24,4 | 14,0 | 15,5 | - | 12,0 | 7,0 | 8,0 | 13,0 | 16,0 | 11,0 | 13,0 |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | P4 | TNO | 14,2 | 19,3 | 14,5 | 18,0 | 12,4 | 16,0 | 7,2 | 11,0 | 12,0 | 15,0 | 10,0 | 12,0 |
| <i>Prop. acidipropionici</i> | 563 | NCDO | 14,1 | 19,1 | 9,2 | 17,5 | 15,4 | 18,0 | 8,0 | 10,7 | 14,4 | 17,3 | 10,3 | 12,4 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 376 | CECT | 16,4 | 20,8 | - | 9,5 | - | - | 15,0 | 17,0 | - | 9,7 | 9,0 | 13,0 |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 551 | CECT | 15,2 | 19,1 | - | 9,0 | - | - | 14,5 | 15,3 | - | 11,5 | 9,0 | 12,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 7973 | NCTC | 14,0 | 18,0 | 11,3 | 14,2 | 11,0 | 13,5 | 7,2 | 8,0 | 11,0 | 16,0 | 8,4 | 12,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LI5sv1/2 | FVM | 14,4 | 18,9 | 12,0 | 15,0 | 10,0 | 14,0 | 7,4 | 7,7 | 13,0 | 16,0 | 8,5 | 11,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 5105 | NCTC | 15,3 | 19,2 | 11,6 | 15,6 | 10,4 | 15,0 | 7,5 | 8,0 | 12,8 | 14,6 | 8,0 | 10,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LI1sv4 | FVM | 14,3 | 18,7 | 11,0 | 14,4 | 12,5 | 17,0 | 8,2 | 8,7 | 11,4 | 15,5 | 9,0 | 10,0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 15,3 | 19,0 | 11,5 | 14,6 | 11,3 | 15,4 | 7,0 | 8,4 | 12,0 | 15,6 | 9,3 | 10,5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 137 | FRI | 13,3 | 17,6 | 12,4 | 17,0 | 13,0 | 16,0 | 7,5 | 11,0 | 12,4 | 16,0 | - | 12,4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 196E | FRI | 13,1 | 16,5 | 13,4 | 15,5 | 12,0 | 16,0 | 7,3 | 11,0 | 12,0 | 16,0 | 11,3 | 14,0 |

Tabla IV.3. (continuación)

| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | COCOS | | | | | | BACILOS | | | | | |
|--------------------------------|----------|---------------------|-------|------|------|------|------|------|---------|------|-----|------|------|------|
| | | | P21 | | T136 | | X13 | | AA24 | | B18 | | S124 | |
| | | | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC | SB | SC |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 334 | ATCC | - | - | - | - | - | - | 16,0 | 18,0 | ND | ND | 8,0 | 16,0 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9338 | CECT | 7,6 | 13,0 | 8,4 | 16,0 | 15,0 | 20,0 | 14,2 | 15,3 | - | 9,0 | - | 8,1 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1193 | NCDO | - | - | - | 8,6 | - | 9,2 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 2714 | NCFB | - | 7,0 | - | - | 13,0 | 16,5 | 10,0 | 11,4 | ND | ND | - | 7,3 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB61 | TNO | 8,2 | 11,0 | 7,3 | 9,7 | 17,0 | 22,6 | 8,2 | 10,1 | - | 8,2 | 7,3 | 9,1 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB63 | TNO | - | - | 6,9 | 8,9 | 12,0 | 16,0 | 10,1 | 11,3 | - | - | - | - |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | DB1275 | TNO | - | - | - | - | - | - | 12,0 | 12,4 | - | - | - | 13,0 |
| <i>Lactococcus cremoris</i> | CNRZ117 | TNO | - | - | - | - | - | - | 14,3 | 16,0 | - | - | - | 13,0 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | EF | TNO | 11,7 | 14,5 | 12,5 | 14,0 | 14,0 | 18,0 | 7,4 | 9,3 | - | - | - | - |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | P4 | TNO | 11,0 | 13,4 | 14,0 | 16,0 | 15,0 | 19,4 | 7,5 | 8,7 | - | 10,6 | - | 8,0 |
| <i>Prop. acidipropionici</i> | 563 | NCDO | 11,0 | 13,0 | 14,6 | 17,2 | 15,0 | 19,0 | 7,7 | 8,4 | - | 10,0 | - | 7,2 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 376 | CECT | 9,0 | 13,7 | 8,0 | 13,0 | 15,0 | 20,0 | 11,0 | 13,0 | - | - | - | 7,5 |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 551 | CECT | 10,0 | 13,5 | - | 11,0 | 14,4 | 19,2 | 13,0 | 15,5 | - | - | - | 7,3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 7973 | NCTC | 10,0 | 13,0 | 12,0 | 15,0 | 14,4 | 17,5 | - | 8,0 | - | 8,0 | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LI5sv1/2 | FVM | 10,5 | 12,7 | 13,0 | 15,5 | 14,0 | 17,5 | 6,2 | 8,6 | - | 10,7 | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 5105 | NCTC | 10,2 | 12,0 | 12,0 | 15,0 | 14,0 | 17,2 | 6,6 | 9,4 | - | 9,4 | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LI1sv4 | FVM | 9,8 | 11,0 | 13,0 | 15,4 | 14,6 | 18,0 | 7,0 | 8,0 | - | 11,0 | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 10,0 | 12,3 | 12,0 | 16,0 | 13,2 | 17,6 | 7,0 | 8,3 | - | 9,6 | - | 7,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | FRI | 137 | - | 13,0 | 13,2 | 15,6 | 15,0 | 16,5 | 7,0 | 8,5 | - | 9,1 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | FRI | 196E | 12,0 | 14,2 | 12,5 | 16,0 | 14,6 | 17,4 | 7,0 | 8,0 | - | 9,6 | - | - |

^aActividad antimicrobiana evaluada mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2) y expresada como diámetro del halo de inhibición en mm; SB, sobrenadante libre de células; SC, sobrenadante libre de células concentrado veinte veces; -, inhibición no detectada empleando 50 µl de SB o SC; ND, no determinado.

^bAbreviaturas como en la Tabla III.1.

Por otra parte, la cepa cocoide G18 y el bacilo AA24 mostraron actividad antimicrobiana frente a la práctica totalidad de las bacterias lácticas, siendo las únicas que inhibieron marcadamente el desarrollo de *Lc. cremoris* DB1275 y *L. cremoris* CNRZ117. Asimismo, es interesante destacar que estas cepas inhibieron muy débilmente a *E. faecalis* EF, a *Propionibacterium* spp. y a los patógenos *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*, pero, sin embargo, resultaron muy activas frente a *Cl. perfringens* CECT376 y *Cl. botulinum* CECT551.

En lo que respecta a las cepas de morfología bacilar B18 y S124, éstas mostraron espectros de acción más reducidos y, además, la actividad antimicrobiana detectada fue mucho más débil. La cepa S124 inhibió débilmente a la mayoría de las bacterias lácticas analizadas; sin embargo, la cepa B18 sólo mostro actividad, en el sobrenadante concentrado, frente a *Lb. fermentum* CECT9338 y *P. pentosaceus* FBB61. Los sobrenadantes concentrados de la cepa S124 inhibieron el desarrollo de *Propionibacterium* spp., *Cl. perfringens* CECT376, *Cl. botulinum* CECT551 y una de las cepas de *Ls. monocytogenes*. Los sobrenadantes de la cepa B18 no fueron activos frente a *Cl. perfringens* CECT376 y *Cl. botulinum* CECT55, pero, sin embargo, inhibieron el desarrollo de *Propionibacterium* spp., de todas las cepas analizadas de *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*.

El hecho de que *E. faecalis* EF, *P. pentosaceus* FBB61 y *Lb. fermentum* CECT9338 sean inhibidos por los sobrenadantes de 8-9 de las 12 cepas analizadas, es decir, por el 66-75%, sugiere su idoneidad como microorganismos indicadores en experimentos preliminares de aislamiento e identificación de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana. Por el contrario, *L. cremoris* CNRZ117 y *Lc. cremoris* DB1275 mostraron una marcada resistencia, siendo únicamente inhibidos por los sobrenadantes de 2 de las 12 cepas evaluadas, es decir, por el 17% de las cepas aisladas.

Ninguna de las 12 bacterias lácticas seleccionadas ejerció actividad antimicrobiana detectable frente a las 6 bacterias Gram-negativas empleadas como microorganismos indicadores (*Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Ps. fluorescens*, *Salmonella thyphimurium* y *Y. enterocolitica*).

IV.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS 12 BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES

Para determinar la inmunidad de las 12 bacterias lácticas seleccionadas a su propia actividad antimicrobiana exocelular, así como para establecer la resistencia o sensibilidad que dichas cepas presentaban entre sí y frente a las bacterias lácticas *P. acidilactici* 347, *L. lactis* BB24, *E. faecium* L50 y *Lb. sake* 148, productoras de pediocina PA-1, nisina A, enterocinas L50A y L50B y lactocina S, respectivamente, se realizó una prueba empleando el método de difusión en agar, en la cual se emplearon como microorganismos indicadores las 12 cepas seleccionadas y las 4 bacterias lácticas citadas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.4 y en base a los mismos se concluye lo siguiente:

1) Todas las bacterias lácticas analizadas son inmunes a sus sustancias antimicrobianas exocelulares.

Tabla IV.4. Actividad antimicrobiana cruzada de las 12 bacterias lácticas seleccionadas, *P. acidilactici* 347, *L. lactis* BB24, *E. faecium* L50 y *Lb. sake* 148 e inmunidad a sus sustancias antimicrobianas exocelulares^a

| Cepa indicadora | COCOS | | | | | | | | | | | | BACILOS | | | | | | | |
|--------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|----|----|----|----|
| | <u>A172</u> | <u>AA13</u> | <u>G16</u> | <u>G18</u> | <u>P13</u> | <u>P20</u> | <u>P21</u> | <u>T136</u> | <u>X13</u> | <u>347</u> | <u>BB24</u> | <u>L50</u> | <u>AA24</u> | <u>B18</u> | <u>S124</u> | <u>148</u> | | | | |
| | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB SC | SB | SC | SB | SC |
| A172 | - - | - - | - - | 17,0 19,0 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 19,6 20,0 | 13,0 19,5 | 17,3 18,6 | - - | 10,0 17,0 | 6,3 14,5 | | | | |
| AA13 | 17,0 23,0 | - - | - 7,4 | 10,0 12,0 | - - | 11,2 15,7 | 11,3 15,2 | 12,7 15,0 | 21,4 27,7 | 16,0 21,0 | 12,6 14,0 | 11,0 16,5 | 10,5 12,5 | - 11,0 | - - | 6,6 10,1 | | | | |
| G16 | 18,0 22,5 | 7,0 11,4 | - - | 11,0 12,4 | - 7,3 | 13,3 16,3 | 14,0 16,0 | 12,2 15,7 | 21,0 27,4 | 18,0 21,0 | 13,5 14,4 | 12,4 16,7 | 9,0 12,0 | - 11,5 | - - | 7,5 11,0 | | | | |
| G18 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 10,0 | - - | - - | - - | - - | - 11,4 | - - | - - | - - | - - | | | | |
| P13 | 18,1 23,1 | - - | 7,0 8,5 | 10,3 13,0 | - - | 13,3 17,2 | 13,2 17,2 | 13,0 16,3 | 23,5 26,0 | 18,0 22,2 | 13,0 14,3 | 12,1 17,3 | 8,4 9,4 | - 12,0 | - - | 7,6 11,4 | | | | |
| P20 | - - | - - | - - | 19,6 19,8 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 20,5 21,0 | 12,2 18,0 | 18,4 20,0 | - - | 14,0 19,0 | 13,6 19,0 | | | | |
| P21 | 18,6 22,4 | 13,2 17,2 | 13,0 16,0 | 8,3 11,4 | 12,0 15,0 | 11,0 15,0 | - - | - - | 18,0 24,0 | 17,0 21,0 | 8,2 10,1 | 14,3 19,0 | 7,5 8,0 | - 12,0 | - - | 9,0 | | | | |
| T136 | 16,5 21,6 | 12,6 15,5 | 12,0 14,5 | 7,0 11,0 | 11,0 13,5 | 10,0 16,0 | - - | - - | 20,0 24,0 | 16,4 21,5 | 7,0 9,0 | 12,3 18,0 | 7,0 8,0 | - 10,5 | - - | 10,0 | | | | |
| X13 | - - | - - | - - | 17,0 17,7 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 18,5 20,0 | 13,0 18,0 | 16,3 19,4 | - - | 9,7 15,3 | 11,6 18,3 | | | | |
| 347 | - - | - - | - - | 19,3 19,4 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | 19,6 21,1 | 13,0 19,0 | 17,3 20,2 | - - | 14,6 17,0 | - 15,0 | | | | |
| BB24 | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - - | - 11,0 | - - | - - | - - | - - | | | | |
| L50 | - 9,4 | - 13,3 | - 7,4 | 7,6 10,4 | - 11,6 | 11,5 16,0 | 12,0 15,6 | 11,3 14,2 | 19,4 24,0 | 20,5 25,2 | 9,0 11,0 | - - | - 9,5 | - 9,0 | - - | 9,0 | | | | |
| AA24 | 9,0 14,5 | - - | - - | 14,0 14,4 | - - | - 6,6 | - 8,0 | 10,0 13,0 | 10,5 16,6 | 10,0 14,0 | 13,5 17,2 | 8,0 9,0 | - - | - - | - 11,0 | - 10,6 | | | | |
| B18 | 9,7 17,4 | 9,4 13,0 | 9,0 11,0 | 12,0 13,2 | 7,5 10,0 | - 7,2 | - 7,6 | 8,3 9,8 | 11,0 16,0 | 9,0 15,0 | 13,0 13,4 | 10,0 15,0 | 11,0 12,3 | - - | - - | - - | | | | |
| S124 | 8,0 12,4 | - - | - - | 11,3 12,0 | - - | - 7,3 | - 7,6 | 10,4 11,5 | 7,0 12,3 | 10,0 12,4 | 9,8 10,5 | 8,0 12,0 | 8,8 9,0 | - - | - - | - - | | | | |
| 148 | - - | - - | - - | 13,7 15,0 | - - | - - | - - | 12,2 13,6 | - - | - - | 16,0 16,4 | 12,0 17,0 | 13,6 16,0 | - - | - - | - - | | | | |

^aActividad antimicrobiana expresada como diámetro del halo de inhibición en mm; SB, sobrenadante libre de células; SC, sobrenadante libre de células concentrado veinte veces.

2) Las cepas A172, P20 y X13 poseen espectros de acción similares, no se inhiben entre sí, no inhiben el desarrollo de *P. acidilactici* 347 (productor de pediocina PA-1) y no son inhibidas por esta bacteriocina. Por todo ello, es posible sugerir que las cepas A172, P20 y X13 sean productoras de pediocina PA-1.

3) Las cepas AA13 y P13 muestran espectros de acción similares y no se inhiben mutuamente, lo que sugiere que producen las mismas sustancias antimicrobianas. Ninguna de ellas inhibe el crecimiento de *P. acidilactici* 347 ni de *L. lactis* BB24 (productor de nisina A); sin embargo, la pediocina PA-1 y la nisina A inhiben su desarrollo, lo cual descarta la posibilidad de que las cepas AA13 y P13 produzcan estas bacteriocinas. Asimismo, el hecho de que estas cepas inhiban a *E. faecium* L50 (productor de enterocinas L50A y L50B) y de que sean inhibidas por los sobrenadantes de esta cepa permite especular que producen sustancias antimicrobianas diferentes a las enterocinas L50A y L50B. La cepa G16 muestra un espectro de acción similar al de las cepas AA13 y P13; sin embargo, estos microorganismos son inhibidos por los sobrenadantes de la cepa G16 y ésta es, a su vez, sensible a los sobrenadantes de las cepas AA13 y P13, lo que sugiere que la cepa G16 produce una sustancia antimicrobiana diferente.

4) Las cepas P21 y T136 poseen espectros de acción similares frente a las bacterias lácticas de morfología cocoide y no se inhiben mutuamente; sin embargo, la cepa T136 es más activa frente a las cepas de morfología bacilar y es, junto con la cepa G18, la única de las cepas cocoides aisladas en este trabajo que inhibe a *Lb. sake* 148 (productor de lactocina S). Las cepas P21 y T136 inhiben el desarrollo de *E. faecium* L50, pero no el de *P. acidilactici* 347 ni el de *L. lactis* BB24. Asimismo, las sustancias antimicrobianas de estas tres cepas inhiben el crecimiento de las cepas P21 y T136. De todos estos resultados se puede especular que estas 2 cepas producen la misma sustancia antimicrobiana, si bien existen diferencias cuantitativas en cuanto a su producción. Asimismo, se puede descartar que esta bacteriocina sea la pediocina PA-1, la nisina A o las enterocinas L50A y L50B.

5) Las cepas AA13 y P13 inhiben el desarrollo de las cepas P21 y T136, y viceversa, lo que sugiere que la sustancia antimicrobiana producida por las cepas AA13 y P13 es diferente a la producida por los aislados P21 y T136. Asimismo, la cepa G16 y las cepas P21 y T136 se inhiben mutuamente lo que sugiere que producen sustancias antimicrobianas diferentes.

6) La cepa G18 destaca por su potente espectro de acción frente al resto de las cepas aisladas, muy similar al mostrado por *L. lactis* BB24. El hecho de que no inhiba a esta cepa y de que sea resistente a la nisina A sugiere que la sustancia responsable de su actividad antimicrobiana es la nisina A.

7) El espectro de acción del bacilo AA24 es considerablemente más amplio que el mostrado por las otras 2 cepas de morfología bacilar aisladas en este trabajo y que el de *Lb. sake* 148. La cepa AA24 es inhibida por *Lb. sake* 148 y, asimismo, este microorganismo es inhibido por los sobrenadantes de la cepa AA24, lo cual permite considerar que la sustancia antimicrobiana responsable de su actividad no es la lactocina S.

8) Las cepas de morfología bacilar B18 y S124 no se inhiben mutuamente, no inhiben a *Lb. sake* 148 y no son inhibidos por la lactocina S, lo cual parece indicar que ambas cepas producen esta bacteriocina. No obstante, estas dos cepas presentan espectros de acción diferentes entre sí y al de *Lb. sake* 148.

IV.5. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS 12 BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS

Las 12 bacterias lácticas seleccionadas se sometieron a la mayoría de las pruebas recomendadas por Schillinger y Lücke (1987) para la identificación rápida de las bacterias lácticas procedentes de la carne y de los productos cárnicos. Los aislados se sometieron también a otras pruebas bioquímicas complementarias, recomendadas por Weiss (1992) y Teuber *et al.* (1992). Para la identificación y clasificación de las especies del género *Enterococcus* se realizaron además algunas de las pruebas clásicas propuestas por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y de las sugeridas por Devriese *et al.* (1993).

IV.5.1. Morfología y tinción por el método de Gram

La tinción por el método de Gram de las 12 bacterias lácticas seleccionadas y su posterior observación al microscopio óptico evidenció que se trataba de un grupo de microorganismos Gram-positivos con morfología variable (Tabla IV.5). Las cepas A172, AA13, G16, G18, P20, P21, T136 y X13 presentaban morfología cocoide y las 3 restantes, las cepas AA24, B18 y S124, mostraron morfología bacilar. Las células cocoides A172, P20 y X13 aparecían en las preparaciones formando pares y tétradas, mientras que las cepas P13 y T136 formaban pares y cadenas. En la cepa G18 se observaron células aisladas y algo mayores, que nunca aparecían formando parejas o tétradas. Las cepas de morfología bacilar se visualizaban generalmente como células aisladas o formando cadenas cortas, en el caso de las cepas B18 y S124, o muy cortas, en la cepa AA24.

IV.5.2. Actividad catalásica

Las 12 cepas analizadas fueron catalasa-negativas (Tabla IV.5).

IV.5.3. Crecimiento en presencia/ausencia de oxígeno

Todas las cepas seleccionadas se desarrollaron en caldo MRS tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis estricta, no detectándose diferencias significativas en el crecimiento tras su incubación a 32°C durante 16 horas.

IV.5.4. Determinación del pH final de los cultivos

Los resultados obtenidos tras determinar el pH de los cultivos en fase estacionaria desarrollados en caldo MRS a 32°C se muestran en la Tabla IV.5. Todas las cepas acidificaron el medio en el que se desarrollaron, haciendo disminuir su pH desde 6,2 a valores entre 4,1 y 4,6.

IV.5.5. Producción de gas a partir de la glucosa

Ninguna de las cepas seleccionadas produjo CO₂ a partir de la glucosa (Tabla IV.5).

IV.5.6. Producción de ácido y diacetilo a partir de la glucosa

Todas las cepas ensayadas resultaron positivas a la prueba del Rojo de metilo, lo que no resulta sorprendente pues todas ellas acidifican el medio de cultivo en el que se desarrollan. En lo

Tabla IV.5. Características morfológicas y bioquímicas de las 12 bacterias lácticas seleccionadas

| Característica | Cepa | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|
| | A172 | AA13 | G16 | G18 | P13 | P20 | P21 | T136 | X13 | AA24 | B18 | S124 |
| Morfología | coco | coco | coco | coco | coco | coco | coco | coco | coco | bacilo | bacilo | bacilo |
| Tinción de Gram | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Formación de tétradas | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Catalasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH ^a | 4,3 | 4,2 | 4,5 | 4,5 | 4,3 | 4,6 | 4,1 | 4,4 | 4,4 | 4,6 | 4,5 | 4,5 |
| Producción de gas ^b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rojo de metilo | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Voges-Proskauer | - | - | d | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| Hidrólisis de la arginina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Isómero del ácido láctico | ND | L | L | ND | L | ND | L | L | ND | ND | ND | ND |
| Crecimiento en: | | | | | | | | | | | | |
| 6,5% NaCl | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10,0% NaCl | + | d | - | - | - | + | - | - | + | + | - | d |
| Crecimiento a: | | | | | | | | | | | | |
| pH 4,5 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH 5,0, 9,0 y 9,6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8°C | ND | ND | ND | ND | + | ND | ND | + | ND | + | + | + |
| 10 y 37°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 45°C | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 50°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

^apH se refiere al pH de los cultivos en fase estacionaria, desarrollados en caldo MRS a 32°C; ^bProducción de CO₂ a partir de la glucosa. Símbolos: +, respuesta positiva o en su caso crecimiento de los cultivos; -, respuesta negativa o ausencia de crecimiento de los cultivos; d, desarrollo débil de los cultivos; ND, no determinado.

que respecta a la prueba de Voges-Proskauer (producción de diacetilo), las cepas de morfología cocoide T136 y P13 y el bacilo B18 resultaron positivas, la cepa cocoide G16 mostró una respuesta débil y el resto de las cepas resultaron negativas (Tabla IV.5).

IV.5.7. Hidrólisis de la arginina

Todas las cepas excepto el bacilo AA24 dieron una respuesta positiva a esta prueba en los dos sistemas experimentales empleados (Tabla IV.5).

IV.5.8. Producción de ácido sulfhídrico

Ninguna de las cepas produjo ácido sulfhídrico en las condiciones experimentales establecidas (Tabla IV.5).

IV.5.9. Tolerancia a distintas concentraciones de cloruro sódico

Las cepas se ensayaron para determinar las máximas concentraciones de cloruro sódico que permitían su crecimiento (Tabla IV.5). Todas las cepas excepto el coco G18 crecieron en caldo MRS suplementado con un 6,5% (p/v) de NaCl. Cuando la concentración de NaCl se elevó hasta el 10%, los cocos A172, P20 y X13 y el bacilo AA24 se desarrollaron con normalidad, el coco AA13 y el bacilo S124 crecieron sólo débilmente y, por último, las restantes cepas no mostraron crecimiento cuantificable.

IV.5.10. Tolerancia a distintos valores de pH

Todas las bacterias lácticas seleccionadas se desarrollaron en caldo MRS cuyo pH se había ajustado a valores de 5,0; 9,0 y 9,6; cuando el pH se ajustó a 4,5, la cepa de morfología cocoide G18 fue la única que no presentó crecimiento cuantificable (Tabla IV.5).

IV.5.11. Crecimiento a diversas temperaturas

Las 12 cepas analizadas se desarrollaron a 10 y a 37°C. Todas excepto el coco G18 y el bacilo S124 mostraron un crecimiento cuantificable a 45°C, pero ninguna se desarrolló a 50°C. El crecimiento a 8°C se determinó únicamente en el caso de los 3 bacilos y de las cepas de morfología cocoide P13 y T136, resultando ser cuantificable en todos ellos (Tabla IV.5).

IV.5.12. Patrones de fermentación de hidratos de carbono

La capacidad de las 12 cepas seleccionadas de fermentar los hidratos de carbono se muestra en la Tabla IV.6. A continuación se indican algunos de los resultados más interesantes:

1) Las 12 cepas fermentaron la ribosa, la galactosa, la D-glucosa, la D-fructosa, la D-manosa, la N-acetil glucosamina, la esculina, la celobiosa, la maltosa, la sacarosa y la trehalosa y, a excepción de la cepa G18, la L-arabinosa, la arbutina y la lactosa. Todas las cepas de morfología cocoide fermentaron además la amigdalina y la salicina.

2) De las 12 cepas ninguna fermentó el eritritol, la D-arabinosa, la L-xilosa, la L-sorbosa, el dulcitol, el inositol, el glucógeno, el xilitol, la D-lixosa, el D-arabitol, el L-arabitol, el gluconato, el adonitol, el β -metil-D-xilosido, el 2-ceto-gluconato, el 5-ceto-gluconato, la D-fucosa ni la L-fucosa. Además, ninguna de las cepas de morfología bacilar fermentó el glicerol, ni la D-xilosa

Tabla IV.6. Patrones de fermentación de hidratos de carbono de las 12 bacterias lácticas seleccionadas

| Hidrato de carbono | A172 | AA13 | G16 | G18 | P13 | P20 | P21 | T136 | X13 | AA24 | B18 | S124 |
|-----------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|
| Glicerol | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Eritritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-arabinosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-arabinosa | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ribosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-xilosa | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| L-xilosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-glucosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-fructosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-manosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| L-sorbosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ramnosa | d | - | - | - | - | - | - | - | d | - | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | d | + | + | d | + | - | + | + | d | + | - | - |
| Sorbitol | - | + | - | d | - | - | - | - | - | + | - | - |
| α -metil-D-manósido | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| α -metil-D-glucósido | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| N-acetil glucosamina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Amigdalina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Arbutina | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |

Tabla IV.6. (continuación)

| Hidrato de carbono | A172 | AA13 | G16 | G18 | P13 | P20 | P21 | T136 | X13 | AA24 | B18 | S124 |
|---------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|
| Esculina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Salicina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Celobiosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Maltosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa | d | + | + | - | + | + | + | + | d | + | + | + |
| Melibiosa | + | + | + | + | + | - | + | d | + | + | + | + |
| Sacarosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Trehalosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Inulina | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Melecitosa | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| D-rafinosa | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Almidón | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glucógeno | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xilitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -gentibiosa | - | + | - | + | - | - | d | d | - | - | - | + |
| D-turanosa | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| D-lixosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-tagatosa | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - |
| D-arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gluconato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Símbolos: +, respuesta positiva; -, respuesta negativa; d, respuesta débil. Ninguna de las cepas analizadas fermentó los siguientes azúcares: adonitol, β -metil xilósido, 2 ceto-gluconato, 5 ceto-gluconato, D-fucosa y L-fucosa.

ni la ramnosa.

3) Las cepas de morfología cocoide variaron en su capacidad de fermentar los siguientes carbohidratos: glicerol, D-xilosa, ramnosa, manitol, sorbitol, α -metil-D-manósido, α -metil-D-glucósido, melibiosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, β -gentibiosa, D-turanosa y D-tagatosa.

Las cepas A172, P20 y X13 fermentaron la D-xilosa pero no fermentaron el glicerol, el sorbitol, el α -metil-D-manósido, el α -metil-D-glucósido, la melecitosa, el almidón, la β -gentibiosa, ni la D-turanosa. Las cepas A172 y X13 fermentaron además la melibiosa, la inulina, la D-rafinosa, la D-tagatosa y, débilmente, la ramnosa y el manitol.

Las cepas AA13, G16, P13, P21 y T136 fermentaron el manitol, la melibiosa y, excepto la cepa AA13, el glicerol. Sin embargo, no fermentaron ni la D-xilosa, ni la ramnosa, ni, excepto la cepa AA13, el sorbitol, el α -metil-D-glucósido, el α -metil-D-manósido, la inulina, la melecitosa, la D-rafinosa, el almidón y la D-turanosa. La cepa T136 fue la única de morfología cocide que fermentó la D-tagatosa.

La cepa G18 fue, junto con la cepa AA13, la única que fermentó el almidón. Asimismo, fermentó la melibiosa, la β -gentibiosa y, débilmente, el manitol y el sorbitol, pero no el glicerol, la D-xilosa, la ramnosa, el α -metil-D-manósido, el α -metil-D-glucósido, la inulina, la melecitosa, la D-turanosa y la D-rafinosa.

4) Las cepas de morfología bacilar variaron en su capacidad de fermentar los siguientes carbohidratos: manitol, sorbitol, α -metil-D-manósido, α -metil-D-glucósido, amigdalina, salicina, inulina, melecitosa, D-rafinosa, β -gentibiosa, D-turanosa y D-tagatosa.

La cepa AA24 fermentó todos los azúcares indicados anteriormente, excepto la β -gentibiosa. Por el contrario, las cepas B18 y S124 no fermentaron ninguno de estos azúcares, excepto la D-rafinosa y, en el caso del bacilo S124, la β -gentibiosa.

En el esquema de identificación rápida de las bacterias lácticas procedentes de la carne y de los productos cárnicos propuesto por Schillinger y Lücke (1987), la respuesta positiva a la tinción de Gram, una reacción catalasa-negativa, la capacidad de producir gas a partir de la glucosa, la morfología, la presencia de tétradas, el crecimiento a 10, 15 y 45°C y la tolerancia a un 6,5% de NaCl constituyen características de gran valor taxonómico. Atendiendo a los resultados obtenidos tras la realización de las pruebas indicadas anteriormente y en base a dicho esquema se asignó tentativamente el género a las 12 bacterias lácticas aisladas:

1) Las cepas A172, P20 y X13 se clasificaron como *Pediococcus* spp., debido a su incapacidad de producir gas a partir de la glucosa, su morfología cocoide y a la disposición de sus células formando tétradas.

2) El coco G18 se clasificó como *Lactococcus* sp., ya que no produjo gas a partir de la glucosa, no se observaron tétradas y se desarrolló a 10 pero no a 45°C.

3) Las cepas AA13, G16, P13, P21 y T136 de morfología cocoide se clasificaron tentativamente como *Enterococcus* spp., debido a la incapacidad de producir gas a partir de la glucosa, la ausencia de tétradas y a su desarrollo a 10 y 45°C y en presencia de un 6,5% de NaCl.

4) Los bacilos AA24, B18 y S124 se incluyeron en el grupo II del género *Lactobacillus*, (género *Streptobacterium* de Orla Jensen o lactobacilos heterofermentativos facultativos), debido

a su incapacidad de producir gas a partir de la glucosa y a su desarrollo a 15°C.

El esquema de identificación de Schillinger y Lücke (1987) presta una especial atención a la clasificación de los lactobacilos, basada fundamentalmente en el patrón de fermentación de hidratos de carbono, el desarrollo a 8°C y la hidrólisis de la arginina; así, pues, atendiendo a los resultados obtenidos tras la realización de las pruebas indicadas anteriormente y en base a este esquema, se asignó tentativamente la especie de las 3 cepas de morfología bacilar:

4.1) La cepa AA24 se identificó como *Lb. plantarum*, ya que fermentó el manitol, no hidrolizó la arginina y fermentó la ribosa y la rafinosa.

4.2) Las cepas B18 y S124 se identificaron como *Lb. bavaricus* o *Lb. sake*, ya que se desarrollaron a 8°C y no fermentaron el manitol, pero sí la ribosa y la melibiosa. Dado que no se pudo asignar la especie concreta a estas cepas, en adelante se denominarán *Lactobacillus* sp.

En el esquema de identificación de los pediococos sugerido por Weiss (1992), la hidrólisis de la arginina, la capacidad de desarrollarse a pH 4,5, a 45°C y en presencia de un 10% de NaCl y el patrón de fermentación de la ribosa, la maltosa, el almidón, la lactosa, la arabinosa y la xilosa constituyen características de gran valor taxonómico. Empleando este esquema de identificación, las cepas A172, P20 y X13 se clasificaron tentativamente como *P. acidilactici* o *P. pentosaceus*, dado que hidrolizaron la arginina, se desarrollaron en presencia de un 10% de NaCl y a valores de pH de 4,5, crecieron a 45°C y fermentaron la ribosa, la maltosa, la lactosa, la L-arabinosa, la D-xilosa pero no el almidón. Hasta que se asigne la especie concreta a estas cepas éstas se denominarán *Pediococcus* sp.

En el sistema de clasificación de los lactococos sugerido por Teuber *et al.* (1992), la hidrólisis de la arginina, la producción de diacetilo, la capacidad de desarrollarse a pH 9,0, a 10 y a 45°C y en presencia de un 6,5% de NaCl, así como la fermentación de la maltosa y el almidón son características muy importantes para su identificación. Aplicando este sistema de clasificación, la cepa G18 se identificó tentativamente como *L. lactis*, ya que hidrolizó la arginina, no produjo diacetilo a partir de la glucosa, se desarrolló a 10°C y a un pH de 9,0, pero no a 45°C ni en presencia de un 6,5% de NaCl y fermentó la maltosa, la galactosa, la melibiosa y la ribosa, pero no la melecitosa ni la D-rafinosa.

IV.5.13. Pruebas complementarias para las bacterias lácticas del género *Enterococcus*

Para confirmar la inclusión de las cepas AA13, G16, P13, P21 y T136 en el género *Enterococcus*, se realizaron algunas de las pruebas selectivas propuestas por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y Devriese *et al.* (1993), como la determinación del tipo de isómero del ácido láctico producido, el crecimiento en un medio de cultivo selectivo con azida sódica, la tolerancia a las sales biliares y la capacidad de fermentar el manitol en presencia de NaCl. Las 5 cepas produjeron únicamente el isómero L-ácido láctico, se desarrollaron en el medio selectivo de azida sódica al 0,04%, toleraron las sales biliares (2%) y fermentaron el manitol en presencia de un 7,5% de NaCl, lo que confirmó su clasificación dentro del género *Enterococcus*. Asimismo, la capacidad de las cepas G16, P13, P21 y T136 de fermentar la L-arabinosa, la melibiosa y el manitol, pero no el sorbitol, la D-rafinosa, la melecitosa, la inulina, el almidón, el 5 ceto-gluconato, la D-turanosa, el adonitol ni la L-sorbosa permitió clasificarlas tentativamente dentro

del grupo *E. faecium*. El patrón de fermentación de hidratos de carbono de la cepa AA13 resultó ser muy diferente al mostrado por las 4 especies del grupo *E. faecium*. La respuesta negativa a la prueba de Voges-Proskauer y la capacidad de fermentar la inulina, la melecitosa, la D-rafinosa, el sorbitol y el α -metil-D-glucósido, pero no el glicerol, permitió clasificar tentativamente la cepa AA13 como *E. saccharolyticus*.

Debido a que algunas cepas del género *Enterococcus* poseen actividad hemolítica y/o ureásica, las 5 cepas se sembraron en placas de Agar sangre y en tubos con Urea Agar Base, lo que demostró que ninguna de ellas hemoliza la sangre de carnero ni hidroliza la urea.

IV.6. IDENTIFICACIÓN Y FILIACIÓN TAXONÓMICA DE LAS 12 BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SU PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS TOTALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

El análisis del patrón electroforético de proteínas totales obtenido por SDS-PAGE (sección III.2.7) permitió establecer taxativamente la filiación taxonómica de las 12 bacterias lácticas a nivel de especie. En la Figura 4.1 se muestran los electroforegramas digitalizados de las proteínas totales de las 12 bacterias lácticas seleccionadas en este trabajo y de *L. lactis* BB24 (Cintas, 1995), *P. acidilactici* 347 (Moreira, 1993), *Lb. sake* 148 (Sobrino, 1993) y *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995; 1998a, b), así como de 11 cepas de *L. lactis*, 9 de *L. cremoris*, 16 de *P. acidilactici*, 13 de *P. pentosaceus*, 7 de *Lb. sake*, 8 de *Lb. sake*-atípico, 8 de *Lb. plantarum* y 13 de *E. faecium*. En esta figura se muestra además el grado de correlación y el agrupamiento en *clusters* de todas las bacterias lácticas incluidas en el análisis comparativo.

Los patrones electroforéticos obtenidos permitieron establecer la siguiente clasificación taxonómica de las 12 bacterias lácticas seleccionadas:

- 1) *Pediococcus* sp. A172, *Pediococcus* sp. P20 y *Pediococcus* sp. X13 se clasificaron como *P. acidilactici* A172, *P. acidilactici* P20 y *P. acidilactici* X13 .
- 2) *L. lactis* G18 se identificó como *L. lactis* subesp. *lactis* G18 (*L. lactis* G18).
- 3) Las cepas del grupo *E. faecium*, P13, P21, T136 y G16, se clasificaron como *E. faecium* P13, *E. faecium* P21, *E. faecium* T136 y *E. faecium*-atípico G16. La cepa clasificada inicialmente como *E. saccharolyticus* se identificó como *E. faecium*-atípico AA13.
- 4) *Lactobacillus* sp. B18 y *Lactobacillus* sp. S124 se identificaron como *Lb. sake*-atípico B18 y *Lb. sake*-atípico S124; asimismo, se confirmó la clasificación de *Lb. plantarum* AA24 .

En base a la filiación taxonómica de las 12 bacterias lácticas y teniendo en cuenta, además, sus espectros de acción antimicrobiana y los resultados de las pruebas de inmunidad y actividad inhibidora cruzada, se seleccionaron para posteriores estudios las cepas *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136. Estas cepas muestran un amplio espectro de acción y, de acuerdo con las pruebas de actividad inhibidora cruzada, producen sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) no descritas hasta la fecha. Por consiguiente, a partir de este momento, el trabajo realizado se centró exclusivamente en la caracterización bioquímica y genética de las sustancias proteicas (bacteriocinas) responsables de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136.

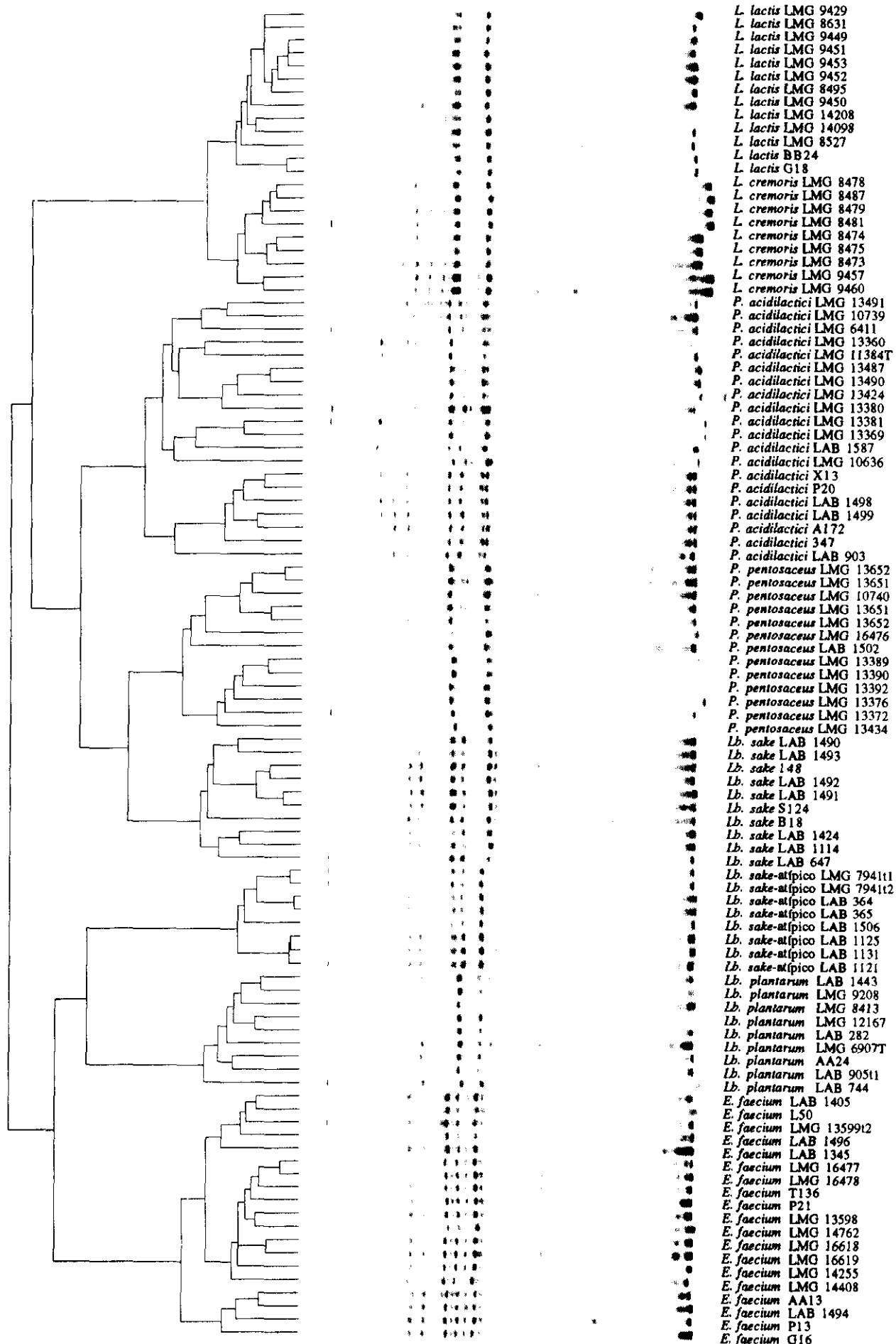


Figura 4.1. Electroforegrama digitalizado de las proteínas totales de las 12 bacterias lácticas seleccionadas en este trabajo y de *L. lactis* BB24 (Cintas, 1995), *P. acidilactici* 347 (Moreira, 1993), *Lb. sake* 148 (Sobrinho, 1993) y *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1995; 1998a,b), así como de 20 cepas de *L. lactis* y *L. cremoris*, 29 de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, 23 de *Lb. sake* y *Lb. plantarum* y 13 de *E. faecium*.

IV.7. ESPECTRO DE ACCIÓN DE *E. faecium* P13 FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Una vez confirmada la identificación taxonómica de la cepa P13 como *E. faecium* P13, se examinó la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes y sus sobrenadantes concentrados, mediante la técnica de difusión en agar, frente a un gran número de bacterias lácticas y microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria. De este modo, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a 22 bacterias lácticas y 22 bacterias Gram-positivas, la mayoría de ellas alterantes y patógenas de los alimentos.

En la Tabla IV.7 se observa que la mayoría de las bacterias lácticas empleadas como microorganismos indicadores no resultaron inhibidas por el sobrenadante de *E. faecium* P13. Así, pues, de las 11 cepas del género *Lactobacillus*, solamente *Lb. curvatus* NCFB2739, *Lb. fermentum* CECT9338 y *Lb. sake* NCFB2714 resultaron inhibidas por el sobrenadante y por el sobrenadante concentrado y, de las 4 cepas del género *Pediococcus*, únicamente fueron sensibles *P. pentosaceus* FBB61 y *P. pentosaceus* FBB63. *E. faecalis* EF resultó inhibido por el sobrenadante y por el sobrenadante concentrado, mientras que *E. faecium* L50 sólo fue sensible al sobrenadante concentrado. Sin embargo, ninguno de los sobrenadantes de *E. faecium* P13 inhibió el desarrollo de *Lc. cremoris*, de las 4 cepas ensayadas del género *Lactococcus* y de *Micrococcus varians* CECT230 (*M. varians* CECT230).

Por el contrario, los sobrenadantes de *E. faecium* P13 mostraron un amplio y potente espectro de acción frente a los microorganismos alterantes y patógenos analizados. El sobrenadante y el sobrenadante concentrado inhibieron el desarrollo de *Ls. innocua* BL86/26, *Cl. sporogenes* C22/10, *St. carnosus* MC1 y las 3 cepas analizadas del género *Propionibacterium*, pero no fueron activos frente a *Cl. tyrobutyricum* NCDO1754. En lo que respecta al espectro de acción frente a microorganismos patógenos, tanto el sobrenadante como el sobrenadante concentrado inhibieron fuertemente el desarrollo de todas las cepas analizadas de *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*, a excepción de *St. aureus* FRI349. Las especies *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum* solamente fueron inhibidas por el sobrenadante concentrado y *Bacillus cereus* ATCC9139 (*B. cereus* ATCC9139) resultó ser el único de los microorganismos patógenos resistente a la actividad inhibidora de los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13.

IV.8. CONDICIONES EXPERIMENTALES ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y PARA LA PRODUCCIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La influencia de la composición del medio de cultivo, de la tensión de oxígeno y de la temperatura de incubación en el crecimiento y en la producción de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinó de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección III.2.9. En todos los ensayos se evaluó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y/o sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13 mediante el método de difusión en agar, empleándose como microorganismo indicador *E. faecium* T136.

Tabla IV.7. Espectro de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13

| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | Inhibición por ^a : | | Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | Inhibición por ^a : | |
|----------------------------------|---------|---------------------|-------------------------------|------|----------------------------------|----------|---------------------|-------------------------------|------|
| | | | SB | SC | | | | SB | SC |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 4356 | ATCC | - | - | <i>Micrococcus varians</i> | 230 | CECT | - | - |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 11842 | ATCC | - | 10,3 | <i>Listeria innocua</i> | BL/8626 | TNO | 12,3 | 16,3 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 334 | ATCC | - | - | <i>Clostridium sporogenes</i> | C22/10 | TNO | 15,5 | 19,4 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 2739 | NCFB | 10,3 | 14,2 | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 3,5CT | TNO | - | 12,0 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 15009 | ATCC | - | 10,0 | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 1754 | NCDO | - | - |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9338 | CECT | 14,7 | 19,4 | <i>Propionibacterium</i> sp. | P4 | TNO | 12,0 | 15,0 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1193 | NCDO | - | - | <i>Propionibacterium</i> sp. | P6 | TNO | 12,0 | 16,0 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 20016 | DSM | - | - | <i>Prop. acidipropionici</i> | 563 | NCDO | 14,4 | 17,3 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 2714 | NCFB | 10,7 | 15,4 | <i>Staphylococcus carnosus</i> | MC1 | TNO | 13,3 | 16,0 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 148 | FVM | - | - | <i>Bacillus cereus</i> | 9139 | ATCC | - | - |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | 2747 | NCFB | - | - | <i>Clostridium perfringens</i> | 376 | CECT | - | 9,7 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | 347 | FVM | - | - | <i>Clostridium botulinum</i> | 551 | CECT | - | 11,5 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB61 | TNO | 8,3 | 13,0 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 7973 | NCTC | 11,0 | 16,0 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB63 | TNO. | 9,7 | 15,3 | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI5sv1/2 | FVM | 13,0 | 16,0 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | PC1 | TNO | - | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5105 | NCTC | 12,8 | 14,6 |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | DB1275 | TNO | - | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI1sv4 | FVM | 11,4 | 15,5 |
| <i>Lactococcus cremoris</i> | CNRZ117 | INRA | - | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 12,0 | 15,6 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | CNRZ148 | INRA | - | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 137 | FRI | 12,4 | 16,0 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | CNRZ150 | INRA | - | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 196E | FRI | 12,0 | 16,0 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | BB24 | FVM | - | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 349 | FRI | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | EF | TNO | 13,0 | 16,0 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 361 | FRI | 12,0 | 16,3 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | L50 | FVM | - | 11,6 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 472 | FRI | 12,0 | 15,4 |

^aActividad antimicrobiana evaluada mediante el método de difusión en agar y expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm. SB, sobrenadante libre de células; SC, sobrenadante libre de células concentrado; -, inhibición no detectada empleando 50 µl de SB o SC. ^bAbreviaturas como en la Tabla III.1.

IV.8.1. Efecto de la composición del medio de cultivo

El efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento y en la producción de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 se determinó tras su incubación en 4 medios de cultivo complejos (MRS, APT, BHI y TSB), en un medio sintético o semidefinido (MB), con o sin suplementos específicos, y en agua de peptona (sección III.1.4.5). El procedimiento empleado para realizar este experimento se detalló en la sección III.2.9.1. El caldo MRS se usó como control al tratarse de un medio de cultivo complejo empleado habitualmente para el desarrollo de las bacterias lácticas.

En la Tabla IV.8 se indica el crecimiento (log ufc/ml) y el pH final de los cultivos, así como la actividad inhibidora (AI, mm²/ml) y la actividad inhibidora específica (AIE, mm²/log ufc) que se detectaron en los sobrenadantes de *E. faecium* P13 cuando se desarrolló aeróbicamente en los diversos medios de cultivo a 32°C durante 16 horas. A continuación se muestran los resultados más interesantes:

1) *E. faecium* P13 se desarrolló en los 11 medios de cultivo empleados, si bien el grado de acidificación y la actividad inhibidora de los sobrenadantes fueron variables.

2) El mínimo crecimiento se obtuvo cuando *E. faecium* P13 se desarrolló en agua de peptona ($1,4 \times 10^8$ ufc/ml). En este medio no se detectó descenso significativo del pH ni producción de sustancias antimicrobianas.

3) El crecimiento en medio base (MB) fue 3,5 veces superior ($5,2 \times 10^8$ ufc/ml) al obtenido en agua de peptona y, además, se detectó un descenso del pH y la presencia de actividad antimicrobiana en los sobrenadantes. Cuando el MB se suplementó con productos hidrosolubles procedentes de la hidrólisis de proteínas de origen cárnico (peptona y proteasa-peptona), lácteo (triptona y caseínas) o mixto (triptosa), no se detectaron modificaciones en el pH de los cultivos pero, sin embargo, aumentaron los valores de crecimiento y de actividad inhibidora (AI y AIE), que fueron máximos cuando el medio base se suplementó con triptona o con caseínas.

4) Los cultivos en APT y MRS mostraron un pH final de 4,4 y 4,3, respectivamente, y aunque el crecimiento fue superior en APT ($1,7 \times 10^9$ ufc/ml frente a $1,1 \times 10^9$ ufc/ml), la actividad inhibidora (AI y AIE) del sobrenadante obtenido con MRS fue aproximadamente el doble de la detectada con el APT.

5) En los medios BHI y TSB, la tasa de crecimiento de *E. faecium* P13 fue similar a la obtenida cuando este microorganismo se desarrolló en caldo MRS, sin embargo, el pH final fue igual o superior a 5,5 y no se detectó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes.

Los resultados obtenidos demuestran que el caldo MRS es el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *E. faecium* P13 y para la producción de su actividad antimicrobiana exocelular.

IV.8.2. Efecto de la tensión de oxígeno

Las bacterias lácticas son microorganismos anaerobios facultativos o microaerófilos, siendo por tanto una característica común a todas ellas la capacidad de desarrollarse en condiciones atmosféricas de tensión de oxígeno. Con objeto de determinar el efecto de la presencia/ausencia de oxígeno en el crecimiento y en la producción de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 se procedió a su incubación en caldo MRS en condiciones de aerobiosis y

Tabla IV.8. Crecimiento y producción de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 en diversos medios de cultivo^a

| Medio de cultivo | Parámetros | | | |
|-----------------------|------------|-----|--------------------------|--------------------------------|
| | log ufc/ml | pH | AI (mm ² /ml) | AIE (mm ² /log ufc) |
| Agua de peptona | 8,17 | 7,1 | - | - |
| MB | 8,72 | 4,2 | 1.334 | 153 |
| MB + Peptona | 8,84 | 4,3 | 1.511 | 171 |
| MB + Proteosa-peptona | 8,87 | 4,3 | 1.511 | 170 |
| MB+ Triptosa | 8,83 | 4,3 | 1.600 | 181 |
| MB + Triptona | 8,98 | 4,3 | 1.772 | 197 |
| MB + Caseínas | 8,83 | 4,3 | 1.696 | 192 |
| BHI | 9,10 | 5,7 | - | - |
| APT | 9,24 | 4,4 | 1.166 | 126 |
| TSB | 9,10 | 5,5 | - | - |
| MRS | 9,05 | 4,3 | 2.512 | 278 |

^aTodos los cultivos se incubaron a 32°C durante 16 horas. La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se determinó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2), empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. Símbolos: pH, pH final de los cultivos; AI, actividad inhibidora; AIE, actividad inhibidora específica; -, actividad inhibidora no detectada empleando 50 µl de sobrenadante.

anaerobiosis estricta durante 16 horas, como se describió en la sección III.2.9.2. Resultados que no se muestran pusieron de manifiesto que la incubación de *E. faecium* P13 en aerobiosis o en anaerobiosis estricta no afecta significativamente a su desarrollo ni a la producción de su actividad antimicrobiana exocelular. En base a estos resultados, todas las incubaciones posteriores de *E. faecium* P13 se realizaron en condiciones de aerobiosis.

IV.8.3. Efecto de la temperatura

Una vez seleccionado el caldo MRS como medio de cultivo y la aerobiosis como condición de tensión de oxígeno, se procedió a determinar la influencia de la temperatura de incubación en el desarrollo y en la producción de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13. De acuerdo con el procedimiento descrito en la sección III.2.9.3, se estableció su cinética de crecimiento y de producción de actividad antimicrobiana en caldo MRS a 4, 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C, así como los parámetros cinéticos de su crecimiento a estas temperaturas.

IV.8.3.1. Cinética del crecimiento y de la producción de actividad antimicrobiana

En la Figura 4.2 se muestra la relación entre el crecimiento (log ufc/ml), el pH del cultivo y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes (AI, mm²/ml) de *E. faecium* P13 cuando se desarrolló en caldo MRS a 4, 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C durante periodos de tiempo variables. En la Tabla IV.9 se indica, para cada temperatura, el valor correspondiente al pH de los cultivos una vez finalizada la incubación, así como los valores máximos de actividad antimicrobiana (AI, mm²/ml) y de actividad antimicrobiana específica (AIE, mm²/log ufc) de los sobrenadantes. Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

1) *E. faecium* P13 manifestó un crecimiento cuantificable a 4, 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C. El valor máximo de crecimiento ($1,9 \times 10^9$ ufc/ml) se obtuvo tras 16 h de incubación a 37°C. A 16, 24 y 32°C los valores máximos ($7,2 \times 10^8$; $7,5 \times 10^8$ y $9,2 \times 10^8$ ufc/ml) representaron tan solo el 38-48% del crecimiento máximo a 37°C y se alcanzaron a las 72, 26 y 24 h de incubación, respectivamente. El desarrollo de *E. faecium* P13 a 45°C fue muy rápido, y el valor máximo de crecimiento ($4,0 \times 10^8$ ufc/ml) se alcanzó a las 6 h de incubación; no obstante, este valor representó únicamente un 21% del obtenido a 37°C. A 8°C se requirieron 20 días de incubación para que el cultivo alcanzara una población de $3,6 \times 10^8$ ufc/ml, que representa un 19% de la obtenida a 37°C. El desarrollo a 4°C fue muy lento y tras 20 días de incubación sólo se alcanzó una población bacteriana de $1,0 \times 10^6$ ufc/ml, que representa un 0,05% de la población máxima obtenida a 37°C.

2) El desarrollo de *E. faecium* P13 a 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C provocó un descenso significativo del pH de los cultivos. A 8, 16, 24 y 32°C el descenso del pH fue mas acusado hacia el final de la fase exponencial del desarrollo microbiano, mientras que a 37 y 45°C la acidificación del medio comenzó a detectarse al inicio de la fase exponencial. El pH final de los cultivos a 16, 24, 32, 37 y 45°C fue inferior a 5,0, detéctándose el mínimo valor (4,2) a 32°C. Finalizada la incubación a 8°C, el pH descendió una unidad con respecto al pH inicial (6,2) y a 4°C el pH no descendió significativamente, ni siquiera tras la incubación del cultivo durante 20 días.

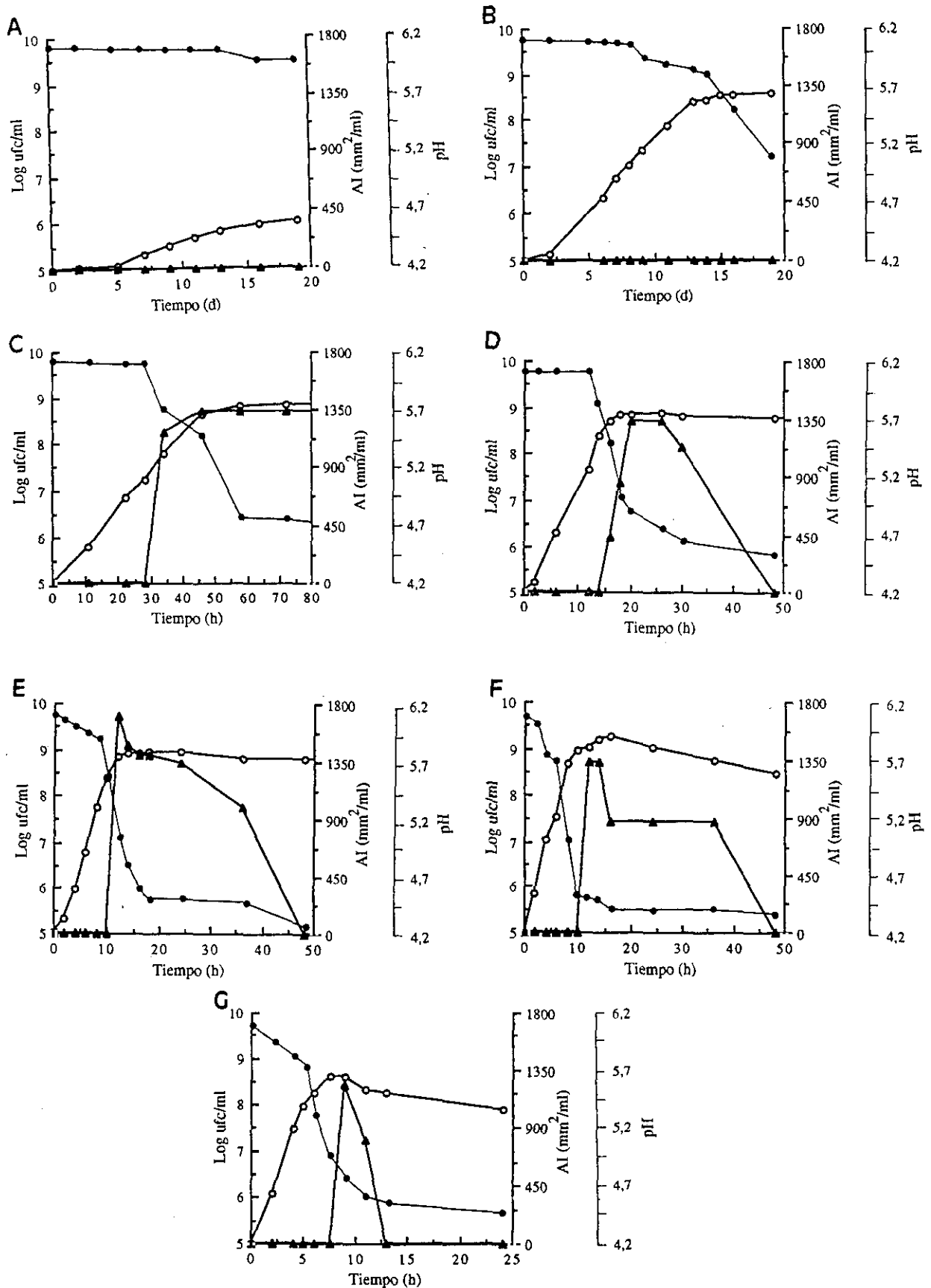


Figura 4.2. Crecimiento (—○—), actividad antimicrobiana (—▲—) y pH (—●—) de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 4 (A), 8 (B), 16 (C), 24 (D), 32 (E), 37 (F) y 45°C (G).

Tabla IV.9. Parámetros cinéticos del crecimiento, pH final y actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a diversas temperaturas

| Parámetro ^a | Temperatura de incubación (°C) | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 4 | 8 | 16 | 24 | 32 | 37 | 45 |
| μ | 0,01 | 0,02 | 0,18 | 0,58 | 0,85 | 0,90 | 1,46 |
| t_d | 69,30 | 34,65 | 3,85 | 1,19 | 0,81 | 0,77 | 0,47 |
| g/h | 0,01 | 0,03 | 0,26 | 0,84 | 1,23 | 1,30 | 2,12 |
| pH | 6.0 | 5.0 | 4.7 | 4.5 | 4.2 | 4.3 | 4.4 |
| AI | 0 | 0 | 1,334 | 1,334 | 1,695 | 1,334 | 1,234 |
| AIE | 0 | 0 | 154 | 150 | 190 | 148 | 143 |

^a μ , velocidad específica de crecimiento (h^{-1}); t_d , tiempo de duplicación (h); g/h, número de generaciones por hora; pH, pH final de los cultivos: a los 20 días de incubación a 4 y 8°C, a las 72 horas a 16°C, a las 48 horas a 24, 32 y 37°C y tras 24 horas a 45°C; La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se determinó mediante el método de difusión en agar (sección III.2.3.2), empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136; AI, actividad antimicrobiana máxima del sobrenadante (mm^2/ml); AIE, actividad antimicrobiana específica máxima del sobrenadante ($mm^2/\log ufc$).

3) La actividad antimicrobiana exocelular se detectó a 16, 24, 32, 37 y 45°C, siendo máxima a 32°C (1.695 mm²/ml). La actividad inhibidora máxima a 16, 24 y 37°C fue idéntica (1.334 mm²/ml) y representó un 79% del valor máximo obtenido a 32°C. A 45°C, la actividad antimicrobiana máxima fue algo menor (1.234 mm²/ml), lo que representa un 73% de la detectada a 32°C. A 16°C la actividad inhibidora comenzó a detectarse hacia la mitad de la fase exponencial; a 24, 32 y 37°C al final de la misma y a 45°C cuando el cultivo había entrado en fase estacionaria. A 16°C la actividad inhibidora comenzó a detectarse cuando el pH descendió a 5,7, y a 24-32°C y 37-45°C cuando el pH fue inferior a 5,5 y a 5,0, respectivamente.

4) A 16°C la actividad antimicrobiana se mantuvo constante durante las 72 h de incubación; sin embargo, a medida que aumentaba la temperatura de incubación se detectó una degradación paulatina de la actividad inhibidora. Así, por ejemplo, tras 30 h de incubación a 24, 32 y 37°C los sobrenadantes presentaron, respectivamente, el 85, el 68 y el 65% de su actividad antimicrobiana máxima. A 45°C la actividad antimicrobiana comenzó a desaparecer muy rápidamente -a las 11 h ya se detectó únicamente el 35% de la actividad antimicrobiana máxima- y tras 13 h de incubación no se cuantificó actividad en el sobrenadante.

Teniendo en cuenta estos resultados y los valores de actividad inhibidora específica que de ellos se derivan, se estableció que 32°C es la temperatura óptima para el crecimiento y para la producción de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13.

IV.8.3.2. Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano

A partir de las gráficas de crecimiento mostradas en las Figura 4.2, y considerando únicamente la fase exponencial del crecimiento, se obtuvieron las correspondientes rectas de regresión, a partir de las que se determinaron los parámetros cinéticos del crecimiento microbiano. En la Tabla IV.9 se indican los valores correspondientes a la velocidad específica de crecimiento (μ), al tiempo de duplicación (t_d) y al número de generaciones por hora (g/h) a las diferentes temperaturas ensayadas. Como puede observarse, a medida que se incrementa la temperatura de incubación aumentan la velocidad específica de crecimiento y el número de generaciones por hora y disminuye, por tanto, el tiempo de duplicación. Los tiempos de duplicación de los cultivos a 24, 32, 37 y 45°C fueron de 1,19; 0,81; 0,77 y 0,47 h, respectivamente; es decir, a estas temperaturas las velocidades de crecimiento fueron relativamente altas, mientras que a 4, 8 y 16°C se requirieron 69,30, 34,65 y 3,85 h, respectivamente, para que se duplicase la masa celular de los cultivos.

IV.9. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13

IV.9.1. Estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 parcialmente purificada

La naturaleza y la estabilidad físico-química de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinaron sometiendo sus sobrenadantes y/o sobrenadantes concentrados a diversos tratamientos enzimáticos y térmicos, a diferentes valores de pH y a un almacenamiento prolongado a varias temperaturas, aplicando la metodología descrita en la sección III.2.10.1.

Finalizados los tratamientos, se determinó la actividad inhibidora (AI, mm²/ml) de los sobrenadantes y, en algunos casos, la actividad inhibidora residual (AIR, %), mediante la técnica de difusión en agar empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136.

IV.9.1.1. Efecto de diversos enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos

La sensibilidad enzimática de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinó tratando alícuotas de sus sobrenadantes con diversos enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) La actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 desapareció por completo de los sobrenadantes tras su tratamiento con todos los enzimas proteolíticos (tripsina, papaína, pepsina, proteasa II, proteasa VI y proteasa XIV).

2) Los enzimas lipolíticos (lipasa I y lipasa VII) y el enzima amilolítico α -amilasa no modificaron la actividad antimicrobiana exocelular, cuantificándose halos de inhibición con un diámetro igual a los producidos por el sobrenadante al que no se añadió enzima.

Estos resultados indican que la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 se debe a un compuesto exocelular de naturaleza proteica (bacteriocina P) cuya actividad biológica no está mediada por componentes lipídicos ni hidrocarbonados.

IV.9.1.2. Efecto combinado del pH y de la temperatura

El efecto combinado del pH y de la temperatura en la actividad inhibidora de *E. faecium* P13 se determinó ajustando el pH de los sobrenadantes a valores entre 2 y 11 y manteniendo las muestras a 25°C y a 4°C durante 24 h. Una vez determinada la actividad inhibidora (AI) de los sobrenadantes, se calcularon los correspondientes valores de actividad inhibidora residual (AIR, %) y se confeccionó el histograma que se muestra en la Figura 4.3, en el que se observa lo siguiente:

1) Independientemente de la temperatura de incubación, la máxima actividad antimicrobiana (2.690 mm²/ml a 4°C y 2.511 mm²/ml a 25°C) se detectó a valores de pH de 4 y 4,7.

2) A valores de pH inferiores, la actividad antimicrobiana residual detectada fue similar a ambas temperaturas y representó el 53-57% (a temperatura de refrigeración) y el 56-60% (a temperatura ambiente) del valor máximo obtenido a 4°C y pH de 4 ó 4,7. Por el contrario, a valores de pH entre 5 y 11, la actividad antimicrobiana se mantuvo más estable a temperatura de refrigeración, detectándose el 70% (1.927 mm²/ml) de la actividad máxima, frente al 43-54% (1.164-1.474 mm²/ml) cuando las muestras se incubaron a temperatura ambiente.

De estos resultados se deduce que la sustancia antimicrobiana de *E. faecium* P13 conserva su actividad en un amplio rango de pHs, tanto a 4 como a 25°C, si bien, es más estable cuando el pH se ajusta a 4 y 4,7 y se mantiene a temperatura de refrigeración.

IV.9.1.3. Estudio de la termorresistencia a pH ácido y neutro

La termorresistencia de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se determinó exponiendo sus sobrenadantes concentrados, con el pH ajustado a 4,5 y a 7,0, a varias temperaturas.

La cinética de termorresistencia de la sustancia antimicrobiana de *E. faecium* P13 a

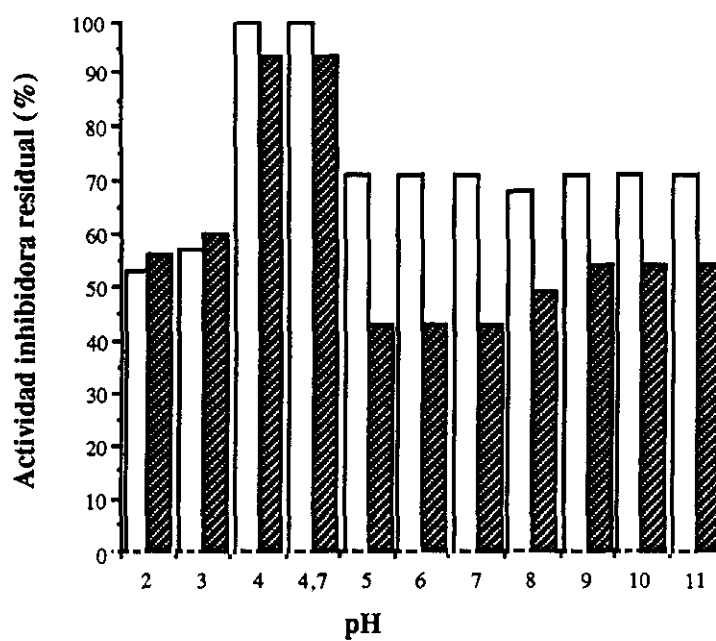


Figura 4.3. Efecto combinado del pH y de la temperatura (□ 4 y ▨ 25°C) en la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de *E. faecium* P13.

80,100,121,135 y 150°C se muestra en la Figura 4.4. Los resultados más interesantes se indican a continuación:

1) El tratamiento de los sobrenadantes concentrados a 80 y a 100°C durante 60 minutos únicamente redujo su actividad antimicrobiana un 11-42% (a pH 4,5) y un 7-40% (a pH 7,0).

2) Cuando la temperatura de calentamiento ascendió a 121°C, tras 15 minutos de exposición los sobrenadantes concentrados de pH 4,5 mantuvieron aún el 42% de su actividad antimicrobiana, mientras que los sobrenadantes concentrados de pH 7,0 mostraron únicamente el 16%.

3) Al aumentar la temperatura de calentamiento a 135°C se observó que tras 6 minutos de tratamiento las actividades antimicrobianas residuales fueron del 45% (a pH 4,5) y de tan sólo el 12% (a pH 7,0). A 150°C, la actividad inhibidora residual de los sobrenadantes concentrados de pH 4,5 fue del 22% después de 6 min de tratamiento, mientras que en el caso de los sobrenadantes concentrados de pH 7,0, a los 3,5 minutos no se detectó actividad inhibidora.

A partir de las gráficas de termorresistencia de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se calcularon, asumiendo una cinética de primer orden, los parámetros cinéticos de su inactivación térmica. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.10, en la que se observa que se requirieron 40, 20 y 9 minutos a 121, 135 y 150°C, respectivamente, para que disminuyese un 90% la actividad antimicrobiana los sobrenadantes concentrados de pH 4,5; sin embargo, los valores D de los sobrenadantes concentrados de pH 7,0 fueron considerablemente inferiores, ya que sólo se necesitaron 16, 7 y 2 minutos a 121, 135 y 150°C, respectivamente, para que la actividad antimicrobiana se redujera a un 90%. En lo que respecta a los valores Z, éstos fueron de 30°C en las muestras cuyo pH se había ajustado a pH 4,5 y de 23°C a pH 7,0.

En base a estos resultados se puede afirmar que la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 posee una elevada termorresistencia a 80, 100, 121, 135 y 150°C y que dicha termorresistencia es pH-dependiente y considerablemente superior a pH 4,5.

IV.9.1.4: Efecto del almacenamiento a distintas temperaturas y pHs

La actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* P13 con el pH ajustado a 4,5 y 7,0 se determinó después de estar almacenadas durante 12 meses a -20°C y 3 meses a 4, 8 y 25°C. El efecto que el almacenamiento a estas temperaturas ejerció en la actividad antimicrobiana se muestra en la Tabla IV.11. Los sobrenadantes mantenidos en congelación, a pH 4,5 ó 7,0, mostraron una actividad inhibidora residual del 98 y del 95%, respectivamente. Asimismo, los sobrenadantes de pH 4,5 almacenados a 4 y a 8°C perdieron sólo un 5 y un 12% de su actividad antimicrobiana inicial, respectivamente, mientras que en los sobrenadantes de pH 7,0 la reducción fue del 12 y del 17%. Por otra parte, el almacenamiento de los sobrenadantes a temperatura ambiente durante 3 meses provocó una pérdida de su actividad antimicrobiana pero, a pesar de ello, los sobrenadantes de pH 4,5 y pH 7,0 mantuvieron el 68 y el 32% de su actividad antimicrobiana original, respectivamente, .

Los resultados obtenidos demuestran la estabilidad de la sustancia antimicrobiana de *E. faecium* P13, especialmente a pH ácido, durante almacenamientos prolongados a temperaturas de congelación y de refrigeración y a temperatura ambiente.

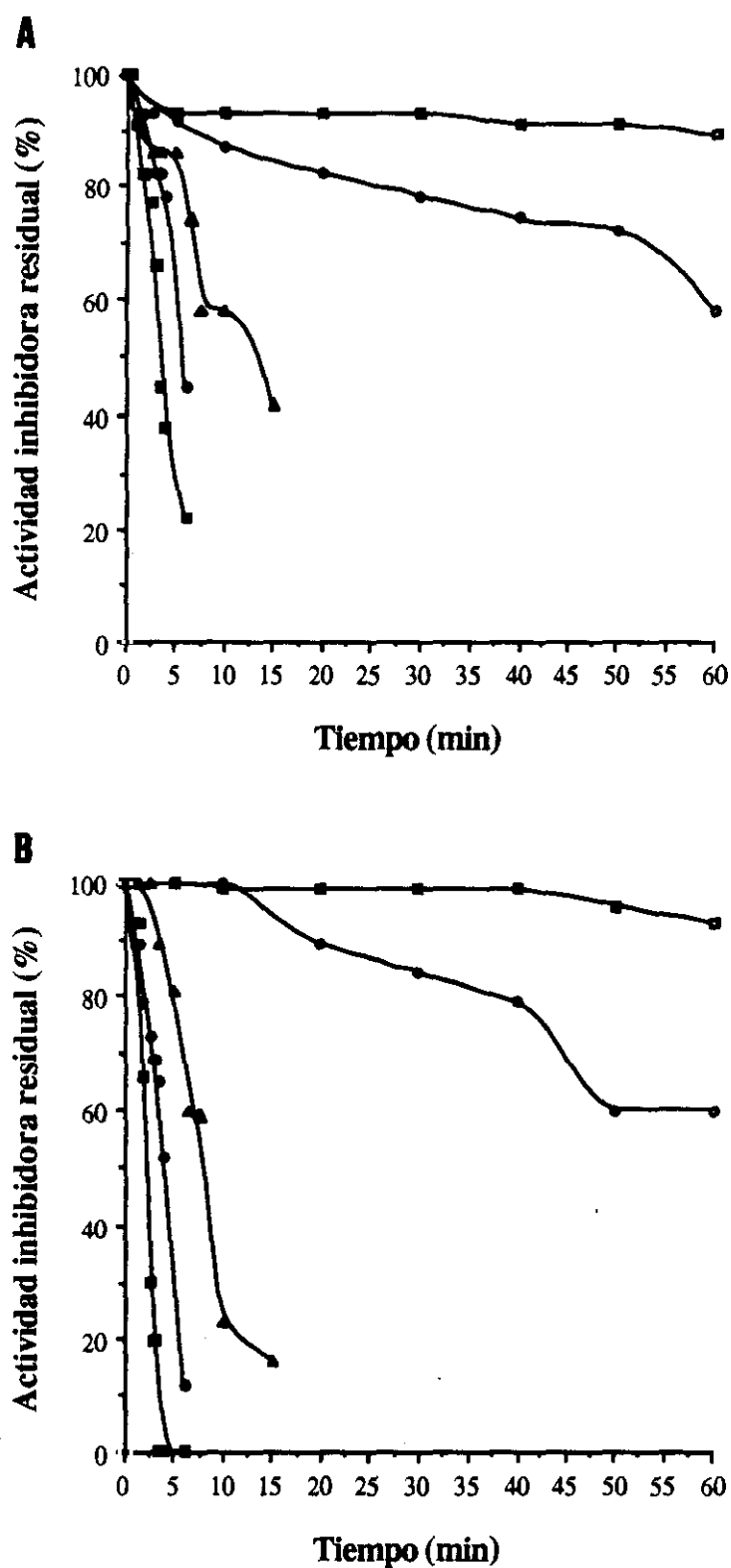


Figura 4.4. Cinética de termorresistencia de la actividad antimicrobiana del sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13, con el pH ajustado a 4,5 (A) y a 7,0 (B), tras su calentamiento a 80 (—□—□), 100 (—○—○), 121 (—▲—▲), 135 (—●—●) y 150°C (—■—■).

Tabla IV.10. Parámetros cinéticos de termodestrucción de la actividad antimicrobiana exocelular del sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13

| Parámetro ^a | Temperatura (°C) | pH del sobrenadante concentrado | |
|------------------------|------------------|---------------------------------|-----|
| | | 4,5 | 7,0 |
| D (min) | 100 | 306 | 235 |
| | 121 | 40 | 16 |
| | 135 | 20 | 7 |
| | 150 | 9 | 2 |
| t _{1/2} (min) | 100 | 212 | 163 |
| | 121 | 28 | 11 |
| | 135 | 14 | 5 |
| | 150 | 6 | 1,5 |
| Z (°C) | | 30 | 23 |

^aD, tiempo necesario para disminuir en un 90% la actividad antimicrobiana inicial a una temperatura determinada; t_{1/2}, tiempo necesario para que la actividad antimicrobiana inicial se reduzca en un 50% a una temperatura determinada; Z, temperatura en °C requerida para disminuir el valor D en un 90%.

Tabla IV.11. Efecto del almacenamiento a diversas temperaturas en la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13^a

| Temperatura (°C) | Actividad antimicrobiana residual del sobrenadante (%) | |
|------------------|--------------------------------------------------------|-----|
| | 4,5 | 7,0 |
| -20 | 98 | 95 |
| 4 | 95 | 88 |
| 8 | 88 | 83 |
| 25 | 68 | 32 |

^aLa actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes (AIR, %) se determinó después de 3 meses de almacenamiento a 4, 8 y 25°C y tras 12 meses a -20°C, mediante el método de difusión en agar, empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136.

IV.9.2. Modo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 parcialmente purificada frente a *Ls. monocytogenes* ScottA

El efecto de la adición de 0,5 y 1 ml de sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13 en el crecimiento de *Ls. monocytogenes* ScottA se muestra en la Figura 4.5, en la que también se muestra, como control, el efecto de la adición de 1 ml de sobrenadante concentrado de *P. acidilactici* 144. El sobrenadante concentrado de *P. acidilactici* 144 no afectó la viabilidad del microorganismo indicador, mientras que la adición de 0,5 ó 1 ml de sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13 provocó un rápido descenso del número de unidades formadoras de colonias, reduciendo drásticamente la población bacteriana inicial ($3,7 \times 10^5$ ufc/ml) en un 81%, es decir, a 7×10^4 ufc/ml, cuando tan sólo habían transcurrido 45 min de incubación. A las 4 horas de incubación, la población bacteriana residual del cultivo al que se habían adicionado 0,5 ml de sobrenadante concentrado era de $1,9 \times 10^4$ ufc/ml, es decir, el 5,1% de la población inicial, lo que equivale a una reducción del 94,9%; sin embargo, la población bacteriana residual del cultivo al que se había añadido 1 ml de sobrenadante concentrado era tan sólo $7,7 \times 10^3$ ufc/ml, lo que representa el 2,1% de la población inicial y, por tanto, una reducción de la misma del 97,9%. Transcurridas 8 horas de incubación, la población residual del cultivo al que se adicionaron 0,5 ml de sobrenadante concentrado ($6,9 \times 10^4$ ufc/ml) representaba el 18,6% de la población inicial, mientras que en el caso de la adición de 1 ml de sobrenadante concentrado representaba únicamente el 3,8% ($1,4 \times 10^4$ ufc/ml). Asimismo, finalizado el tratamiento, la población bacteriana de los cultivos a los que se añadieron 0,5 y 1 ml de sobrenadante concentrado representó un 0,03 y un 0,007% de la población final de *Ls. monocytogenes* ScottA en el cultivo control ($2,0 \times 10^8$ ufc/ml).

IV.9.3. Purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13

La purificación de la sustancia antimicrobiana se llevó a cabo a partir del sobrenadante libre de células obtenido por centrifugación de 1 litro de cultivo de *E. faecium* P13 (inóculo del 0,005%) desarrollado en caldo MRS a 32°C durante 16 horas. En primer lugar se precipitaron las proteínas del sobrenadante con sulfato amónico y, posteriormente, se aplicaron las técnicas cromatográficas de filtración en geles, intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa (FPLC), según el protocolo descrito en la sección III.2.10.3.2. La actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se detectó y se cuantificó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4), empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136.

El esquema de purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se muestra en la Tabla IV.12, en la que aparecen, entre otros parámetros, el incremento de la actividad antimicrobiana específica y la recuperación de la actividad antimicrobiana en cada una de las etapas del proceso de purificación. La actividad antimicrobiana inicial detectada en el sobrenadante libre de células (fracción I) fue de 455 UB/ml. La precipitación de las proteínas del sobrenadante con 500 g/l de sulfato amónico permitió concentrar la sustancia antimicrobiana en

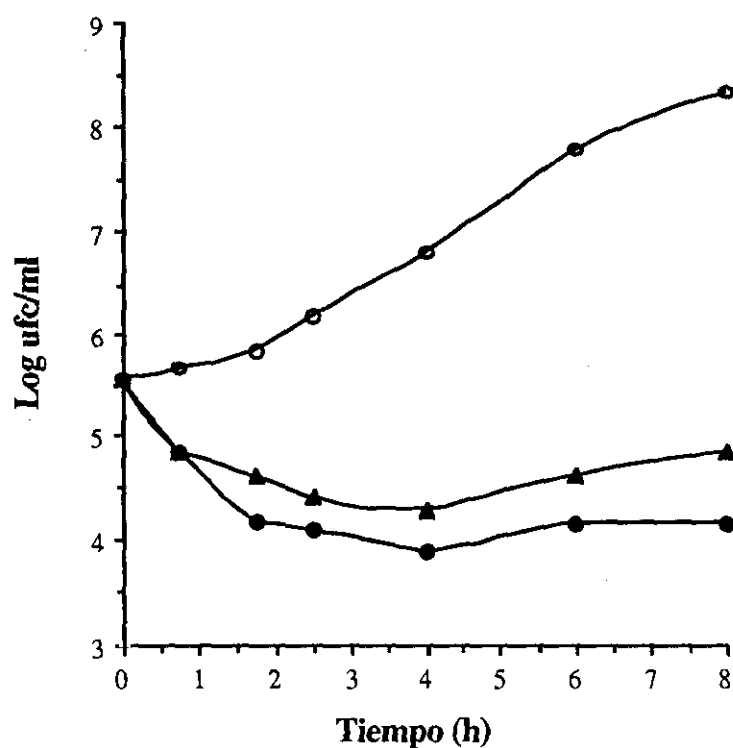


Figura 4. 5. Efecto de la adición de 0,5 ml (—▲—▲—▲) y 1,0 ml (●—●—●) de sobrenadante concentrado de *E. faecium* P13 en el crecimiento de *Ls. monocytogenes* Scott A. Desarrollo de *Ls. monocytogenes* Scott A (—○—○—○) tras la adición de 1ml de sobrenadante concentrado de *P. acidilactici* 144.

un volumen de 120 ml (fracción II) con una recuperación del 99% y un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 8 veces, con respecto a la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células. La fracción II se cromatografió a continuación en columnas de filtración en geles (Sephadex G-25), pues de otro modo resultaba infructuosa la subsiguiente cromatografía de intercambio catiónico. El eluato recogido (fracción III) mostró una actividad antimicrobiana específica 8 veces superior a la del sobrenadante y una recuperación del 77%. La fracción III se aplicó a una columna de intercambio catiónico (SP-Sepharose) y tras la elución con 50 ml de una solución 1M de NaCl en tampón NaP se obtuvo la fracción IV, la cual presentó una actividad antimicrobiana específica 106 veces mayor que la original y una recuperación del 61%. Esta fracción se aplicó a una columna de interacción hidrofóbica (Octyl-Sepharose CL-4B), eluyéndose con 10 ml de una solución de alcohol etílico al 70% (v/v) la fracción V, cuya actividad antimicrobiana específica era 3.657 veces la original y cuya actividad antimicrobiana total representaba el 90% de la detectada en el sobrenadante. Seguidamente, la fracción V, eluida de la columna de interacción hidrofóbica (PepRPC HR5/5), se aplicó a una columna de fase reversa, integrada en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). En la Figura 4.6 se muestra el cromatograma obtenido, en el que se observan al principio de la elución unas sustancias que no mostraron actividad antimicrobiana y que, probablemente, corresponden a componentes del medio de cultivo. Cuando el gradiente de elución alcanzó un 35% de 2-propanol, comenzó a eluir un pico con actividad antimicrobiana, cuya elución terminó cuando la concentración de 2-propanol fue de, aproximadamente, un 37%. Las fracciones con actividad antimicrobiana (fracciones 15 y 16) se mezclaron y se recromatografiaron en la misma columna bajo similares condiciones, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la Figura 4.7, en el que se observa un único pico de absorbancia a 254 nm (fracción 8), que eluyó a una concentración de 2-propanol del 29-30% y que mostró una actividad antimicrobiana total de 129.162 UB. La actividad antimicrobiana específica de esta fracción (fracción VI, Tabla IV.12) fue de 1.845.171 UB, es decir, 115.323 veces superior a la del sobrenadante libre de células, y representó una recuperación del 28% de la actividad antimicrobiana original.

A juzgar los cromatogramas obtenidos, la proteína con actividad antimicrobiana (bacteriocina P) producida por *E. faecium* P13 estaba purificada a homogeneidad, por lo que se procedió a determinar la concentración de proteína de la muestra purificada (fracción VI, Tabla IV.12), según el procedimiento descrito en la sección III.2.10.3.5. La concentración de bacteriocina P en la muestra fue de 26,4 µg/ml y, por tanto, la cantidad total de bacteriocina obtenida tras el proceso de purificación fue de 26,4 µg.

IV.9.4. Composición aminoacídica de la bacteriocina P

El análisis comparativo de los cromatogramas de los hidrolizados ácidos de la muestra de bacteriocina P de *E. faecium* P13 purificada a homogeneidad (Fracción VI, Tabla VI.12) y de los aminoácidos patrón, ambos obtenidos mediante cromatografía de intercambio catiónico (HPLC), permitió determinar la composición aminoacídica de la bacteriocina P que se muestra en la Tabla IV.13. Debido a la hidrólisis ácida a la que se somete la muestra, el triptófano no se puede detectar ya que se destruye y, por otra parte, la asparragina y la glutamina se hidrolizan, originándose ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, por lo que no se puede

Tabla IV.12. Purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular producida por *E. faecium* P13

| | Volumen (ml) | Absorbancia total ₂₅₄ ^a | Actividad total (UB) ^b | Actividad específica ^c | Incremento en la actividad específica ^d | Recuperación (%) |
|----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| Sobrenadante (Fracción I) | 1.000 | 27.500 | 455.593 | 16 | 1 | 100 |
| Precipitación con sulfato amónico (Fracción II) | 120 | 3.324 | 451.914 | 137 | 8 | 99 |
| Cromatografía de filtración en geles (Fracción III) | 230 | 2.739 | 352.000 | 130 | 8 | 77 |
| Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción IV) | 50 | 160 | 276.114 | 1.726 | 106 | 61 |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción V) | 10 | 7 | 409.600 | 58.514 | 3.657 | 90 |
| Cromatografía de fase reversa (Fracción VI) | 1 | 0,07 | 129.162 | 1.845.171 | 115.323 | 28 |

^aAbsorbancia total₂₅₄, absorbancia a 254 nm multiplicada por el volumen en mililitros. ^bActividad antimicrobiana total (UB), recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el desarrollo de *E. faecium* T136, multiplicado por el volumen en mililitros. ^cActividad antimicrobiana específica, actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A total ₂₅₄. ^dActividad antimicrobiana específica de la fracción correspondiente dividida por la del sobrenadante.

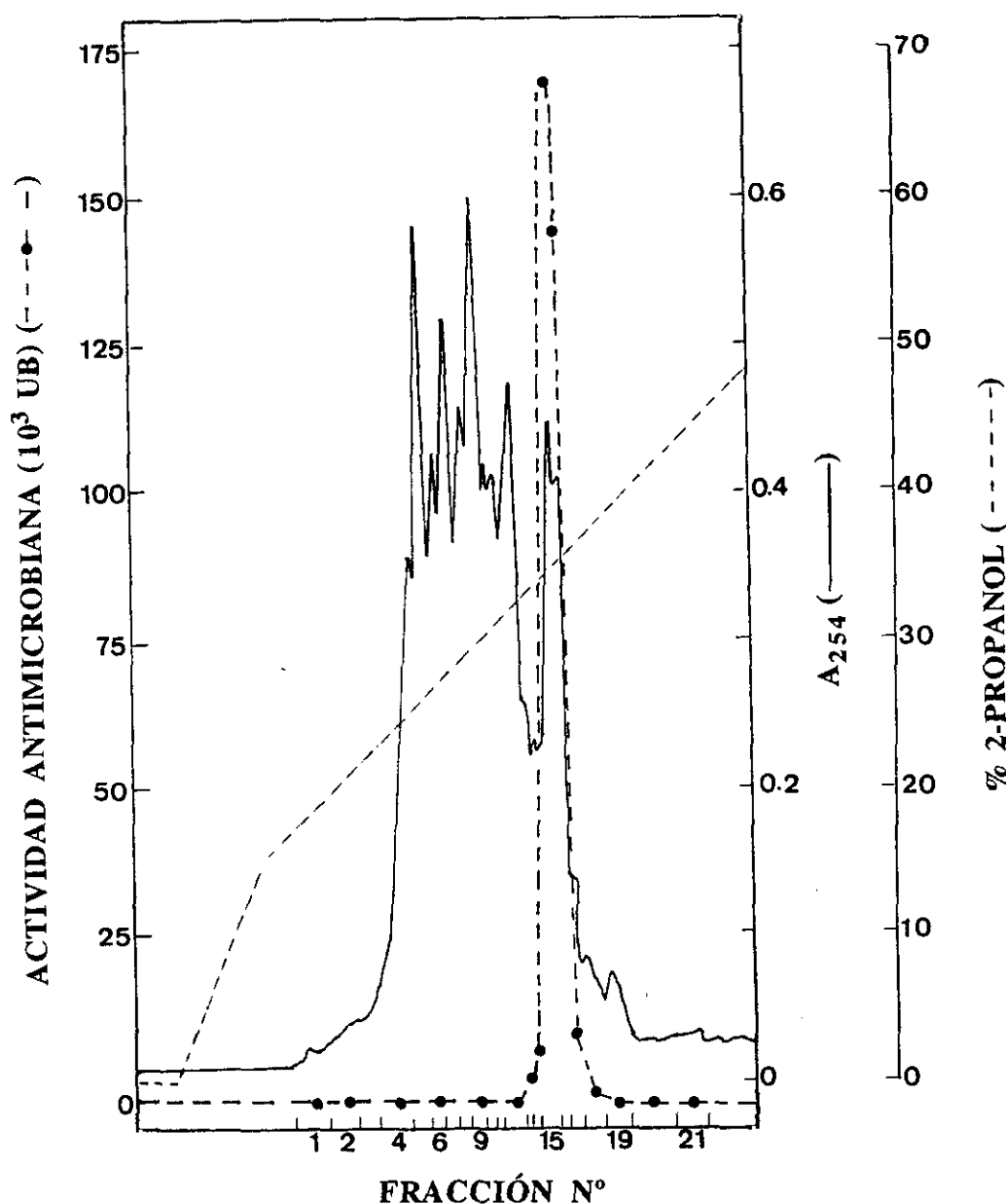


Figura 4.6. Purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (fracción V; Tabla IV.12). Las fracciones con actividad inhibidora (fracciones 15 y 16) se mezclaron y se recromatografiaron bajo condiciones similares.

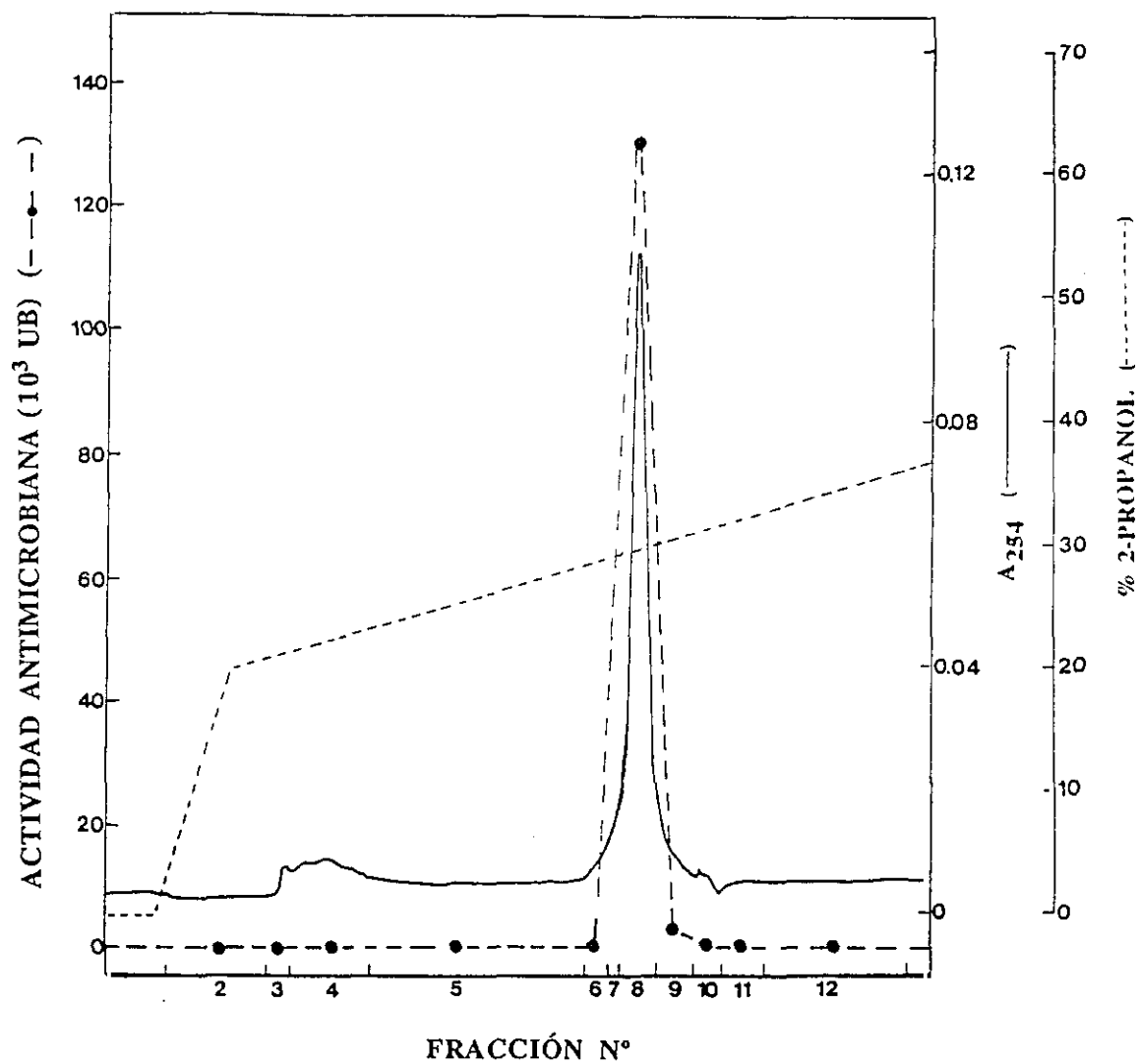


Figura 4.7. Purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de las fracciones con actividad inhibidora de la Figura 4.6.

determinar con certeza el número total de residuos polares sin carga neta o con carga neta negativa. Los resultados más interesantes se indican a continuación:

1) Se reconoce la existencia de una molécula proteica (bacteriocina P) de 37-41 residuos aminoácidos, de los cuales 6 residuos, es decir el 15-16%, son glicina, 12-15 residuos, es decir el 32-36% de la molécula, corresponden a aminoácidos apolares y 19-20 residuos corresponden a aminoácidos polares (49-51%).

2) En cuanto a los aminoácidos apolares, se detecta la presencia de los aminoácidos alifáticos alanina (4), isoleucina (2), leucina (2), valina (2) y prolina (0-1); asimismo, es posible que la molécula contenga el aminoácido sulfurado metionina (0-1) y los aminoácidos aromáticos fenilalanina (0-1) y tirosina (2).

3) Dentro de los aminoácidos polares se encuentran 3 ó 4 residuos con carga neta positiva a pH 6,0-7,0, entre los que se incluyen la arginina (1 residuo), la lisina (2) y, probablemente, la histidina (1) y, al menos, 8 residuos sin carga neta a pH 6,0-7,0. Los restantes 8 residuos corresponden a aminoácidos con carga neta negativa o sin carga (4 residuos de Asx [Asp/Asn] y 4 residuos de Glx [Glu/Gln]).

IV.9.5. Secuencia aminoacídica de la bacteriocina P

La degradación directa de Edman permitió determinar la secuencia de 43 aminoácidos del extremo N-terminal de la bacteriocina P purificada a homogeneidad (Figura 4.8). La molécula presenta la secuencia Tyr-Gly-Asn-Gly-Val, entre las posiciones 5 y 9, que es idéntica a la secuencia consenso característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina (sección II.4.1). Los aminoácidos correspondientes a las posiciones 15, 17, 34 y 36 no pudieron determinarse con certeza, aunque probablemente corresponden a lisina (Lys15), triptófano (Trp17), glicina (Gly34) y alanina (Ala36). Asimismo, no pudo identificarse el aminoácido correspondiente a la posición 1 (Xaa1). Aunque no se pudo establecer con certeza, es posible que la molécula contenga un último residuo en posición 44, que correspondería al aminoácido histidina (His44).

A partir de estos resultados se obtuvo la composición aminoacídica de la bacteriocina P que se muestra en la Tabla IV.13. Con respecto a los 8 residuos sin carga neta o con carga neta negativa (4 Asx y 4 Glx) detectados por hidrólisis ácida, la degradación de Edman mostró que la bacteriocina posee 2 residuos de ácido glutámico (Glu22 y Glu25) y 5 residuos de asparagina (Asn7, Asn12, Asn13, Asn19 y Asn26), pero que carece de ácido aspártico y de glutamina. Teniendo en cuenta la presencia del residuo de histidina en el extremo C-terminal, la bacteriocina P estaría constituida por 44 aminoácidos, lo cual concuerda con el número de residuos deducido de la composición aminoacídica obtenida por hidrólisis ácida (41 residuos), si a este valor se le suman los tres residuos de triptófano obtenidos por degradación de Edman. El análisis de varias muestras de bacteriocina P, mediante espectrometría de masas, no permitió determinar su masa molecular.

La secuencia aminoacídica del fragmento N-terminal de la bacteriocina P, producida por *E. faecium* P13, se comparó con las secuencias de otras bacteriocinas de los bancos de datos SWISS-PROT, SWISS-NEW, TREMBLNEW, PDB-PROTEIN y PIR, no encontrándose identidad con ninguna de ellas. Así, pues, la bacteriocina P, producida por *E. faecium* P13, es

Tabla IV.13. Composición aminoacídica de la enterocina P de *E. faecium* P13

| Aminoácido | Contenido (pmol) | Número de residuos | | |
|------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | Por hidrólisis ^a | Por secuencia ^b | Por genética ^c |
| Asx | 1.345,2 | 4 | 5 | 5 |
| Ala | 1.245,6 | 4 | 4 | 5 |
| Arg | 339,0 | 1 | 1 | 1 |
| Cys | 631,7 | 2 | 2 | 2 |
| Gly | 1.987,3 | 6 | 8 | 8 |
| Glx | 1.340,8 | 4 | 2 | 2 |
| His | 285,4 | 0-1 | 0-1 | 1 |
| Ile | 541,1 | 2 | 3 | 3 |
| Leu | 606,1 | 2 | 1 | 1 |
| Lys | 650,6 | 2 | 2 | 2 |
| Met | 65,2 | 0-1 | 1 | 1 |
| Phe | 244,8 | 0-1 | 0 | 0 |
| Pro | 307,6 | 0-1 | 0 | 0 |
| Ser | 1.240,0 | 4 | 4 | 4 |
| Thr | 600,8 | 2 | 1 | 1 |
| Trp | ND | ND | 3 | 3 |
| Tyr | 698,5 | 2 | 2 | 2 |
| Val | 598,5 | 2 | 3 | 3 |
| Xaa | ND | ND | 1 | 0 |
| Total | | 37-41 | 43-44 | 44 |

^aNúmero más probable de residuos aminoacídicos por molécula asumiendo que la enterocina P contiene 1 residuo de arginina.

^bNúmero de residuos aminoacídicos de la enterocina P a partir de la secuencia proteica obtenida mediante degradación de Edman.

^cNúmero de residuos aminoacídicos de la enterocina P a partir de la secuencia proteica obtenida mediante la secuenciación de su correspondiente gen estructural.

Código trisílabo de los aminoácidos: Ala, Alanina; Arg, Arginina; Asn, Asparragina; Asp, Ácido aspártico; Cys, Cisteína; Gln, Glutamina; Glu, Ácido glutámico; Gly, Glicina; His, Histidina; Ile, Isoleucina; Leu, Leucina; Lys, Lisina; Met, Metionina; Phe, Fenilalanina; Pro, Prolina; Ser, Serina; Thr, Treonina; Trp, Triptófano; Tyr, Tirosina; Val, Valina. Asx, Asparragina o Ácido aspártico; Glx Glutamina o Ácido glutámico.

Símbolos: Xaa, residuo aminoacídico no identificado; ND, no determinado.

Figura 4.8. Secuencia aminoacídica de la enterocina P de *E. faecium* P13 obtenida por degradación de Edman

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|---|---|----|-------------------------|---|----|----|---|---|---|-----|----|---|
| | 1 | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15* | | |
| N | Xaa-Thr-Arg-Ser- | <u>Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-</u> | | | | Tyr-Cys-Asn-Asn-Ser-Lys | | | | | | | | | |
| | X | T | R | S | Y | G | N | G | V | Y | C | N | N | S | K |
| | | * | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | |
| | Cys-Trp-Val-Asn-Trp-Gly-Glu-Ala-Lys-Glu-Asn-Ile-Ala-Gly-Ile | | | | | | | | | | | | | | |
| | C | W | V | N | W | G | E | A | K | E | N | I | A | G | I |
| | | | | * | 35 | * | | | 40 | | | | | | |
| | Val-Ile-Ser-Gly-Trp-Ala-Ser-Gly-Leu-Ala-Gly-Met-Gly-? | C | | | | | | | | | | | | | |
| | V | I | S | G | W | A | S | G | L | A | G | M | G | | |

Código trisílabo de los aminoácidos como en la Tabla IV.13.

Código monosílabo de los aminoácidos: A, Alanina; R, Arginina; N, Asparagina; D, Ácido aspártico; C, Cisteína; Q, Glutamina; E, Ácido glutámico; G, Glicina; H, Histidina; I, Isoleucina; L, Leucina; K, Lisina; M, Metionina; F, Fenilalanina; P, Prolina; S, Serina; T, Treonina; W, Triptófano; Y, Tirosina; V, Valina.

Símbolos: Xaa (X), residuo aminoacídico no identificado. Los asteriscos indican que el residuo aminoacídico no se pudo determinar con certeza. La interrogación señala que posiblemente existe un residuo de histidina en la posición 44.

Se ha subrayado la secuencia consenso que presentan las bacteriocinas del tipo pediocina.

una nueva bacteriocina y se denominó enterocina P.

IV.9.6. Efecto del ditriitol (DTT) en la actividad antimicrobiana de la enterocina P

La muestra de enterocina P purificada a homogeneidad se trató con el agente reductor DTT, a una concentración de 10mM, durante 12-14 h a 30°C (sección III.2.10.7). Una vez excluido el efecto inhibitor del DTT en el desarrollo del microorganismo indicador (*E. faecium* T136) se determinó el porcentaje de reducción de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina tratada con este agente reductor. La actividad antimicrobiana residual de la enterocina P fue de 16.383 UB/ml, frente a las 35.431 UB/ml cuantificadas en el correspondiente control, lo que supone una reducción en su actividad biológica del 54%.

IV.9.7. Concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina P frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria

La concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina P purificada a homogeneidad se determinó, mediante un ensayo en placas microtituladoras, frente a un gran número de bacterias lácticas y microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, según el procedimiento descrito en la sección III.2.10.8. En la Tabla IV.14 se muestran las concentraciones de enterocina P que fueron necesarias para inhibir en un 50% el desarrollo de cada microorganismo indicador. De las 22 bacterias lácticas analizadas solamente 8 resultaron inhibidas por la enterocina P purificada a homogeneidad, obteniéndose CIMs muy bajas (1-22 ng/ml) frente a *Lb. curvatus* NCFB2739, *Lb. fermentum* CECT9338, *P. pentosaceus* FBB63 y *L. lactis* BB24; sin embargo, se requirieron 69-238 ng/ml para inhibir en un 50% el desarrollo de *Lb. sake* NCFB2714, *P. pentosaceus* FBB61, *E. faecium* L50 y *E. faecalis* EF. Empleando una concentración máxima de bacteriocina de 1,25 µg/ml no se inhibió el desarrollo de *M. varians* CECT230.

La enterocina P purificada a homogeneidad resultó muy efectiva frente a todos los microorganismos alterantes analizados. Así, pues, se requirieron tan sólo entre 4 y 37 ng/ml de bacteriocina para inhibir en un 50% el desarrollo de *Cl. sporogenes* C22/10 y de las dos cepas analizadas del género *Propionibacterium*, mientras que para inhibir el crecimiento de *Ls. innocua* BL/8626, *St. carnosus* MC1 y las 2 cepas analizadas de *Cl. tyrobutyricum* fueron necesarios 139-559 ng/ml de enterocina P.

Asimismo, la enterocina P resultó ser un potente inhibidor del desarrollo de todos los microorganismos patógenos empleados como indicadores, siendo destacables las bajas CIMs requeridas para inhibir el desarrollo de *Cl. perfringens* CECT376 (4 ng/ml) y de 4 de las cepas analizadas de *Ls. monocytogenes* (18-39 ng/ml). Por otra parte, concentraciones de enterocina P entre 125 y 294 ng/ml fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *Cl. botulinum* CECT551, *B. cereus* ATCC9139 y 4 de las cepas analizadas de *St. aureus*.

Los resultados obtenidos demuestran que la enterocina P purificada a homogeneidad mantiene su amplio y potente espectro de acción y que sólo se requieren pequeñas concentraciones de bacteriocina -entre 4 y 294 ng/ml- para inhibir en un 50% el crecimiento de la

Tabla IV.14. Concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina P de *E. faecium* P13^a

| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | CIM (ng/ml) | Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | CIM (ng/ml) |
|----------------------------------|---------|---------------------|----------------|----------------------------------|----------|---------------------|----------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 4356 | ATCC | - | <i>Micrococcus varians</i> | 230 | CECT | - |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 11842 | ATCC | - | <i>Listeria innocua</i> | BL/8626 | TNO | 395 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 334 | ATCC | - | <i>Clostridium sporogenes</i> | C22/10 | TNO | 4 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 2739 | NCFB | 17 | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 3,5CT | TNO | 559 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 15009 | ATCC | - | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 1754 | NCDO | 412 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9338 | CECT | 1 | <i>Propionibacterium</i> sp. | P4 | TNO | 37 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1193 | NCDO | - | <i>Propionibacterium</i> sp. | P6 | TNO | 26 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 20016 | DSM | - | <i>Prop. acidipropionici</i> | 563 | NCDO | ND |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 2714 | NCFB | 144 | <i>Staphylococcus carnosus</i> | MC1 | TNO | 139 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 148 | FVM | - | <i>Bacillus cereus</i> | 9139 | ATCC | 286 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | 2747 | NCFB | - | <i>Clostridium perfringens</i> | 376 | CECT | 4 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | 347 | FVM | - | <i>Clostridium botulinum</i> | 551 | CECT | 259 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB61 | TNO | 136 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 7973 | NCTC | 35 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB63 | TNO | 18 | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI5sv1/2 | FVM | 33 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | PC1 | TNO | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5105 | NCTC | 18 |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | DB1275 | TNO | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI1sv4 | FVM | 39 |
| <i>Lactococcus cremoris</i> | CNRZ117 | INRA | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 125 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | CNRZ148 | INRA | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 137 | FRI | 190 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | CNRZ150 | INRA | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 196E | FRI | 407 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | BB24 | FVM | 22 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 349 | FRI | 221 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | EF | TNO | 238 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 361 | FRI | 294 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | L50 | FVM | 69 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 472 | FRI | 269 |

^aLa CIM de la enterocina P purificada se determinó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.8). ^bAbreviaturas como en la Tabla III.1.
 Símbolos: -, inhibición no detectada empleando 1,25 µg/ml de enterocina P; ND, no determinado.

mayoría de los microorganismos alterantes y patógenos, incluidas bacterias de gran importancia higiénico-sanitaria como *Ls. monocytogenes*, *B. cereus*, *St. aureus*, *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*.

IV.10. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13

IV.10.1. Obtención de mutantes de *E. faecium* P13 deficientes en la producción de enterocina P y en su inmunidad

Alícuotas de un cultivo puro de *E. faecium* P13 con fenotipos Ent⁺ (capacidad de producir enterocina P) e Inm⁺ (inmunidad a esta bacteriocina) se incubaron a 32°C durante 72 horas en caldo MRS con distintas concentraciones de novobiocina (sección III.2.11.1). La concentración de novobiocina de 1 µg/ml permitió un crecimiento normal de *E. faecium* P13, obteniéndose recuentos de $6,5 \times 10^8$ ufc/ml; sin embargo, empleando 2,5 µg/ml de novobiocina la población se mantuvo en los niveles iniciales (1×10^5 ufc/ml) y cuando se aumentó la concentración de novobiocina a 5,0 y a 7,5 µg/ml los recuentos obtenidos fueron de $1,4 \times 10^4$ y de 3×10^3 ufc/ml, respectivamente. De los cultivos con 1,0; 2,5 y 5,0 µg/ml de novobiocina se seleccionaron al azar 48 colonias y se determinó su capacidad de producir enterocina P mediante la técnica de inhibición por siembra en picadura, empleando *E. faecium* T136 como microorganismo indicador. La concentración de novobiocina de 1 µg/ml no indujo la aparición de colonias con fenotipo distinto al salvaje (Ent⁺); sin embargo, empleando 2,5 y 5,0 µg/ml de novobiocina se obtuvieron, respectivamente, 5 y 20 colonias con fenotipo Ent⁻. Diez de estas colonias se inocularon en caldo MRS y se incubaron a 32°C durante 16 horas para, posteriormente, confirmar su fenotipo Ent⁻ y determinar su inmunidad a la enterocina P mediante la técnica de difusión en agar. Ninguno de los sobrenadantes obtenidos mostró actividad antimicrobiana frente a *E. faecium* T136 y, por otra parte, todos los cultivos fueron sensibles (Inm⁻) al sobrenadante de un cultivo de *E. faecium* P13 con fenotipo Ent⁺. La estabilidad de los fenotipos Ent⁻Inm⁻ se confirmó mediante un ensayo en placas microtituladoras después de realizarse 3 transferencias consecutivas de los cultivos en caldo MRS.

A continuación, se seleccionaron las cepas PM5, PM10, PM18 y PM20, de fenotipos Ent⁻Inm⁻, para intentar asociar los nuevos fenotipos a la curación de algún plásmido específico.

IV.10.2. Aislamiento y visualización del ADN total de *E. faecium* P13 y de los mutantes seleccionados

El ADN cromosómico y plasmídico de *E. faecium* P13 y de los mutantes PM5, PM10, PM18 y PM20 se aisló a partir de 10 ml de sus cultivos en caldo MRS, según el método de lisis alcalina descrito por Anderson y McKay (1983), con las modificaciones indicadas en la sección III.2.11.2. Los resultados obtenidos tras realizar la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) se muestran en la Figura 4.9. El ADN cromosómico de *E. faecium* P13 y de los mutantes seleccionados se visualizó como una mancha nucleotídica única en la porción superior del gel. En lo que respecta al ADN plasmídico, tanto *E. faecium* P13 como los 4 mutantes seleccionados

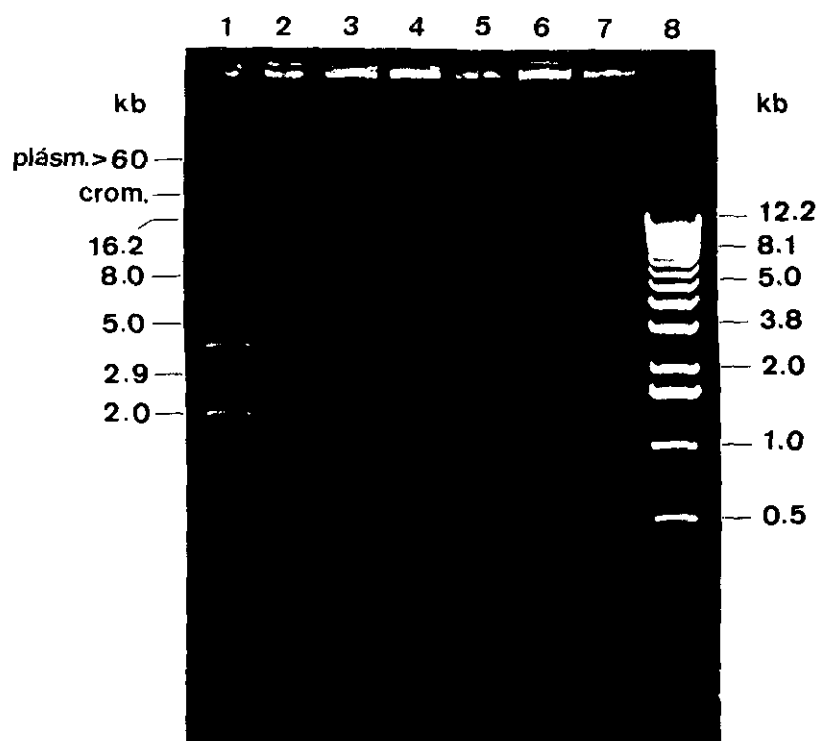


Figura 4.9. Electroforesis en gel de agarosa del ADN cromosómico y plasmídico de *E. faecium* P13 (2), de los mutantes PM5 (3), PM10 (4), PM18 (5) y PM20 (6) y de *E. faecium* T136 (7). En las columnas 1 y 8 se muestran los marcadores del tamaño molecular del ADN plasmídico y del ADN lineal, respectivamente.

mostraron un solo plásmido de elevado tamaño molecular, posiblemente mayor de 60Kb, localizado encima de la banda cromosómica. Dado que la cepa de fenotipos Ent⁺Inm⁺ y las de fenotipos Ent⁺Inm⁻ mostraron el mismo perfil plasmídico resultó imposible determinar la localización plasmídica o cromosómica de los determinantes genéticos que codifican la producción de enterocina P y su inmunidad.

IV.10.3. Secuenciación del gen estructural de la enterocina P y de su hipotético gen de inmunidad

La secuencia nucleotídica del fragmento de 995 pb del ADN de *E. faecium* P13 que contiene el gen estructural de la enterocina P (*entP*) y su hipotético gen de inmunidad (*entiP*) se determinó secuenciando diversos fragmentos de PCR mediante el método enzimático de Sanger o método didesoxi de finalización de cadena, como se describió en la sección III.2.11.10. La secuencia y la dirección de los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en los experimentos de PCR o de secuenciación, su temperatura de fusión y su localización con respecto a la secuencia aminoacídica de la enterocina P y/o a la de su hipotética proteína de inmunidad se muestran en la Tabla IV.15. La orientación y la posición relativa de los oligonucleótidos sintéticos en el fragmento secuenciado de 995 pb se muestra en la Figura 4.14.

IV.10.3.1. Obtención de la primera secuencia nucleotídica

A partir de la secuencia aminoacídica de la enterocina P, obtenida mediante degradación de Edman (Figura 4.8), se diseñó el oligonucleótido degenerado ENTP1, seleccionando para ello una zona de la secuencia que indujera la mínima degeneración del código genético. El fragmento seleccionado correspondió a los residuos aminoacídicos comprendidos entre las posiciones 16 y 23 (Figura 4.10). A partir de esta secuencia aminoacídica se dedujo la secuencia del ARN mensajero correspondiente y la del ADN que en él se transcribe. Esta secuencia de ADN mostraba tres tripletes de doble ambigüedad y dos de cuádruple, por lo que el número de secuencias posibles era de 128. Con el objeto de disminuir el grado de degeneración del cebador ENTP1 se decidió introducir la base neutra inosina (I) -que se aparea de forma estable con las cuatro bases nitrogenadas (Ohtsuka *et al.*, 1985)- en las posiciones de cuádruple ambigüedad, por lo que el número de secuencias posibles se redujo a 8. A continuación, se realizaron tres PCRs hemiespecíficos (sección III.2.11.6.3) empleando como ADN molde muestras que contenían fragmentos del ADN total de *E. faecium* P13 digerido con los enzimas de restricción *DraI*, *RsaI* o *SspI* (sección III.2.11.3) y ligados en el vector fagémido pBluescript II SK+ (sección III.2.11.5), previamente tratado con *HincII* (mezclas de ligación *DraI*, *RsaI* y *SspI*) (sección III.2.11.4.2) y, como cebadores, el oligonucleótido degenerado ENTP1 y el oligonucleótido SK2 (específico del vector) biotinizado en su extremo 5'. La etapa de hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2 min. La electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) reveló un fragmento mayoritario de 0,7 Kb empleando la mezcla de ligación *DraI* y uno de 0,5 Kb con la ligación *RsaI*. El fragmento 0,5 Kb-*RsaI* se extrajo del gel de agarosa y, a continuación, se purificó para eliminar productos que pudieran interferir en las reacciones de secuenciación posteriores (secciones III.2.11.7 y III.2.11.8). A continuación, se separaron las dos hebras de ADN del

Tabla IV.15. Oligonucleótidos sintéticos empleados en las experiencias de PCR y de secuenciación del gen estructural de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de su hipotético gen de inmunidad

| Nombre | Empleo | Secuencia nucleotídica (5' - 3') | T _m (°C) ^a | Loc ^b | Dir ^c |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------|
| ENTP1 (d) | PCR _H SEQ | TGY TGG GTI AAY TGG GGI GAR GC | 60,7 | 16-23 | 5' - 3' |
| ENTP2 | PCR _{H,N} SEQ | GAT TTA TTA CTT TTC ATA GTA TTA ATG TCC | 54,5 | 43-6 _i | 3' - 5' |
| ENTP3 | PCR _{H,N} SEQ | CCAGCATTACTATTATTACAATAAACACCATTACC | 60,8 | 6-17 | 3' - 5' |
| ENTP4 | SEQ | CTCATTTGTATTCTTCGGGGAATTAATTCATTCC | 61,7 | * | 3' - 5' |
| ENTP5 | PCR _N SEQ | CTTTCAACAAAGTTCTAGAATTAAGTAAACAGC | 60,5 | (6-17) _i | 5' - 3' |
| TH8 | PCR _N SEQ | CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG AG | 60,7 | - | 5' - 3' |
| SK2 (bio) | PCR _{H,N} SEQ | CCG CTC TAG AAC TAG TGG ATC | 54,2 | - | 5' - 3' |

^aT_m (°C), temperatura de fusión del ADN.

^bLoc, localización de los oligonucleótidos en la secuencia aminoacídica de la enterocina P o en la de su hipotética proteína de inmunidad (números con subíndice i); *, el cebador ENTP4 se localiza a 12 pb *upstream* de la secuencia repetida inversa izquierda (SRIi) mostrada en la Figura 4.14; -, los cebadores TH8 y SK2 se localizan en el vector comercial pBluescript II SK +.

^cDir, se refiere a la dirección de los oligonucleótidos con respecto a la hebra codificante; es decir, hacia su extremo 3' ó *downstream* (5' - 3') o hacia su extremo 5' ó *upstream* (3' - 5').

Los paréntesis indican: (d), oligonucleótido degenerado; (bio), oligonucleótido biotinizado. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; la modalidad de PCR se indica con los subíndices: H, hemiespecífico; N, anidado. SEQ, reacciones de secuenciación.

Los desoxirribonucleótidos con las diferentes bases nitrogenadas del ADN se indican como: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina; Y (C/T); R (A/G); I, base universal inosina

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por la autora, a excepción de TH8 y SK2, cuyas secuencias son específicas del vector comercial pBluescript II SK +.

Código trisílabo de los aminoácidos como en la Tabla IV.13; código monosílabo de los aminoácidos y símbolos como en la Figura 4.8. Los desoxirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.15.

IV. Resultados

fragmento, gracias a la especificidad del cebador SK2 marcado con biotina por la estreptavidina (sección III.2.11.10.2), y se secuenciaron las hebras positiva (biotinizada) y negativa, empleando como cebadores de secuenciación ENTP1 y SK2, respectivamente. Tras la autorradiografía correspondiente se pudieron leer con claridad un total de 134 pb (Figura 4.11A). A partir de esta secuencia nucleotídica se dedujeron las posibles secuencias aminoacídicas y, tras compararlas con la de la enterocina P, se confirmó que la hebra 5'-3' (hebra codificante) del fragmento secuenciado contenía el extremo 3' del gen estructural de la enterocina P (*entP*), que codifica su extremo C-terminal, entre los aminoácidos 29 y 44 (Figura 4.11B), obteniéndose de este modo la primera pauta específica de secuenciación.

IV.10.3.2. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3'

A partir de la secuencia nucleotídica de 134 pb obtenida con ENTP1 y SK2 se diseñó el cebador específico ENTP5 y, a continuación, se realizó un PCR anidado hemiespecífico empleando, como ADN molde, el fragmento 0,7 Kb-*DraI* obtenido anteriormente con ENTP1 y SK2 y, como cebadores, SK2 y ENTP5 (interno con respecto a ENTP1). La etapa de hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 45 seg. Finalizada la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8 (p/v) se visualizó una única banda de 590 pb. El fragmento 590 pb-*DraI* se purificó directamente del producto de PCR y, a continuación, se obtuvieron los correspondientes fragmentos de ADN de cadena sencilla y se secuenció la hebra positiva, empleando ENTP5 como cebador de secuenciación. Tras la autorradiografía correspondiente se empezó a leer, con la carrera electroforética corta, a una distancia de 12 pb del cebador ENTP5, lo que permitió un solapamiento de 15 pb con respecto a la secuencia de 134 pb obtenida con ENTP1 y SK2. Solapando las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas se determinó una secuencia de 301 pb.

IV.10.3.3. Secuenciación desde el final del gen estructural hacia su extremo 5'

A partir de la secuencia nucleotídica de 134 pb obtenida con ENTP1 y SK2 se diseñó el cebador específico ENTP2. A continuación, se realizaron tres PCRs hemiespecíficos empleando, como ADN molde, las mezclas de ligación *DraI*, *RsaI* y *SspI* y, como cebadores, el oligonucleótido específico ENTP2 y SK2 biotinizado. La etapa de hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2,5 min. Tras realizar la electroforesis del producto de PCR correspondiente a la ligación *SspI* se visualizaron numerosos fragmentos de intensidad débil, en el obtenido empleando la ligación *DraI* se visualizaron 2 fragmentos de tamaño similar (750 y 800 pb) y en el correspondiente a la ligación *RsaI* se visualizó un único fragmento de 250 pb, el cual se seleccionó para llevar a cabo su secuenciación. La visualización de una única banda permitió la purificación del fragmento 250 pb-*RsaI* directamente a partir del producto de PCR. A continuación, el fragmento se convirtió a cadena sencilla y se secuenció la hebra positiva, empleando ENTP2 como cebador de secuenciación. Con la carrera electroforética corta se empezó a leer a una distancia de 4 pb del cebador ENTP2, lo que permitió confirmar las 40 pb correspondientes al principio de la secuencia de 134 pb obtenida con ENTP1 y SK2. Solapando las secuencias obtenidas con las

Figura 4.11. Secuencia nucleotídica de 134 pb del fragmento 0,5 Kb-*Rsa*I de *E. faecium* P13 amplificado por PCR empleando los cebadores ENTP1 y SK2 (A) y secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de la enterocina P codificado por la cadena en dirección 5'-3' (B)^a

(A)

```

1
5' CAGGAATCGTTATTAGTGGCTGGGCTTCTGGTTTGGCAGGTATGGGACATTAATACTATGAAAAGTAATAAATCTTTCAACA
3' GTCCTTAGCAATAATCACCGACCCGAAGACCAAACCGTCCATACCCCTGTAATTATGATACTTTTCATTATTTAGAAAGAAGT

                                     134
AAGTTCTAGAATTAACTGAAACAGCATTAGCCACCCCAGAAATTAAAAAGA 3'
TTCAAGATCTTAATTGACTTTGTGCTAATCGGAGGGGTCTTTAATTTTTTCT 5'
  
```

(B)

```

1                                     52
5' CA GGA ATC GTT ATT AGT GGC TGG GCT TCT GGT TTG GCA GGT ATG GGA CAT TAA ...3'
    G  I  V  I  S  G  W  A  S  G  L  A  G  M  G  H  *
  
```

^aLa secuencia aminoacídica codificada por la cadena 5'-3' corresponde a la región entre los aminoácidos 29 y 43 de la secuencia peptídica de la enterocina P obtenida por degradación de Edman. El residuo aminoacídico en cursiva corresponde al aminoácido de la posición 44, que no fué identificado con certeza mediante degradación de Edman. Las posiciones correspondientes a los cebadores ENTP2 y ENTP5 aparecen subrayadas en las cadenas 3'-5' y 5'-3', respectivamente, en la figura (A). Los desoxirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.15. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8. El asterisco indica el codon de terminación de la traducción (UAA).

dos carreras electroforéticas se obtuvo la secuencia de 137 pb desde el final de *entP* hacia su extremo 5'.

IV.10.3.4. Secuenciación desde la mitad del gen estructural hacia su extremo 5'

A partir de la secuencia nucleotídica de 137 pb obtenida con ENTP2 se diseñó un nuevo cebador específico, ENTP3, para continuar la secuenciación desde la mitad de *entP* hacia su extremo 5'. Empleando como ADN molde las ligaciones *DraI* y *SspI* y como cebadores ENTP3 y SK2, se realizaron dos PCRs hemiespecíficos con una temperatura de hibridación de 55°C durante 30 seg y un tiempo de polimerización a 72°C de 1 min. Tras realizar la electroforesis de los productos de PCR, en el correspondiente a la ligación *SspI* se visualizaron numerosos fragmentos de intensidad débil y en el obtenido empleando la ligación *DraI* se visualizaron 2 fragmentos muy próximos, de 645 y 695 pb, que no se pudieron extraer del gel por separado. Por este motivo, se decidió realizar un PCR anidado hemiespecífico sobre la mezcla de ligación *DraI* bajo condiciones similares, pero empleando la pareja de cebadores ENTP2 (cebador externo a ENTP3) y TH8 (cebador externo a SK2) y, a continuación, efectuar una electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% (p/v) para incrementar el poder de resolución de fragmentos de tamaño similar. Finalizada la electroforesis, se visualizaron nuevamente 2 fragmentos, de 793 y 843 pb aproximadamente, pero esta vez lo suficientemente separados como para permitir su extracción del gel de forma independiente. A continuación, para elucidar cual de los dos fragmentos era el positivo, se realizaron dos PCRs anidados hemiespecíficos empleando, como ADN molde, una muestra con el fragmento pequeño (793 pb-*DraI*-ENTP2-TH8) y otra con el fragmento grande (843 pb-*DraI*-ENTP2-TH8) y, como cebadores internos, SK2 y ENTP3. Con el PCR del fragmento pequeño se consiguió amplificar un único fragmento de 640 pb (640 pb-*DraI*-ENTP3-SK2). La visualización de una única banda en el gel de agarosa permitió la purificación del fragmento 640 pb-*DraI*-ENTP3-SK2 directamente del producto de PCR. El fragmento purificado se convirtió a cadena sencilla y se secuenció la hebra positiva empleando ENTP3 como cebador de secuenciación. Con la carrera electroforética corta se empezó a leer a una distancia de 16 pb del cebador ENTP3, lo que permitió un solapamiento de 14 pb con respecto a la secuencia de 137 pb obtenida con ENTP2. Solapando las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas se obtuvo una secuencia total de 296 pb, que permitió finalizar la secuenciación del gen estructural de la enterocina P y del correspondiente a su hipotética proteína de inmunidad y avanzar hacia el extremo 5'.

IV.10.3.5. Avance de la secuenciación hacia el extremo 5'

A partir de la secuencia nucleotídica de 296 pb obtenida con ENTP3 se diseñó el cebador ENTP4, que se utilizó como cebador interno para secuenciar nuevamente la hebra positiva del fragmento 640 pb-*DraI*-ENTP3-SK2. Tras la autorradiografía correspondiente, se leyó con la carrera electroforética corta a una distancia de 11 pb de la secuencia del cebador ENTP4, lo que permitió confirmar las 51 pb del principio de la secuencia de 296 pb obtenida anteriormente. Solapando las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas se determinó una secuencia de 247 pb hacia el extremo 5'.

La integración de los resultados anteriores permitió obtener la secuencia de 995 nucleótidos

contiguos del ADN de *E. faecium* P13 que se muestra en la Figura 4.12.

IV.10.4. Análisis del gen estructural de la enterocina P, de su hipotético gen de inmunidad y de las regiones adyacentes. Identificación de las regiones nucleotídicas relacionadas con el inicio de la transcripción y de la traducción

El análisis informático de la secuencia nucleotídica de 995 pb del ADN de *E. faecium* P13 obtenida mediante la secuenciación de varios productos de PCR reveló que contiene tres marcos de lectura abiertos (ORF) con la misma polaridad (hebra 5'-3'), denominados *orfX*, *entP* y *entP* (Figuras 4.12 y 4.14).

El ORF central, denominado *entP*, corresponde al gen estructural de la bacteriocina y codifica un péptido de 71 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de 7.552 dáltones (Da). Mediante la comparación de esta secuencia aminoacídica con la obtenida para la enterocina P por degradación de Edman, se deduce que esta bacteriocina se sintetiza como un precursor o prepéptido (pre-enterocina P) que contiene una extensión N-terminal de 27 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de 2.940 Da (Figura 4.13; Tabla IV.16). El punto de procesamiento de la bacteriocina se sitúa inmediatamente después de los residuos Val-Asp-Ala (posiciones -3 a -1) de la extensión N-terminal, lo que da lugar a un péptido de 44 aminoácidos (enterocina P) con un tamaño molecular teórico de 4.630 Da (Figura 4.13; Tabla IV.16).

La expresión génica en los procariotas, al igual que en los eucariotas, se rige por los procesos de transcripción y traducción. La clave de la iniciación de la transcripción es la unión de la ARN polimerasa a una región del ADN denominada promotor y la conversión de aquella a un estado activo, con lo que comienza la síntesis del ARN mensajero (ARNm) correspondiente. El estudio de la estructura de numerosos promotores de la ARN polimerasa de *E. coli* y de algunas bacterias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Cl. pasteurianum* y *Lactococcus* spp., ha permitido definir un promotor consenso para este enzima (Rosenberg y Court, 1979; Moran *et al.*, 1982; Hawley *et al.*, 1983; Graves *et al.*, 1986; Van Der Vossen *et al.*, 1987; Koivula *et al.*, 1991). En este promotor, localizado delante (*upstream*) del gen correspondiente, se distinguen dos regiones hexaméricas: una en posición -10 -con respecto al punto de iniciación de la transcripción- fuertemente conservada y rica en A+T, denominada secuencia TATA o de Pribnow (*Pribnow box*, secuencia consenso: TATAAT) (Pribnow, 1975), y otra en posición -35, menos conservada, cuya secuencia consenso es TTGACA. El espacio entre estas dos secuencias tiene gran importancia para el correcto funcionamiento del promotor y es generalmente de 17 ± 1 nucleótidos. En este contexto, el análisis de la región nucleotídica localizada delante del gen estructural de la enterocina P (*entP*) permitió identificar dos secuencias hexaméricas, separadas por 19 nucleótidos, correspondientes a las regiones -10 y -35 de su hipotético promotor (Figura 4.12). La secuencia de la región -10 (TATAAT) coincide completamente con la secuencia consenso y la secuencia de la región -35 (TTATCA) difiere únicamente en los dos nucleótidos internos. En la región del promotor de *entP* se identificaron, además, dos juegos de secuencias repetidas directas (SRD1 y SRD2) y uno de secuencias repetidas inversas (SRI). Las SRD1 consisten en dos secuencias de 9 pb (TTATG[A/C]T[A/T]T) separadas por una región de 12 pb rica en A y T. La secuencia TTATGATAT, localizada 2 pb

Figura 4.12. Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P (*entP*) de *E. faecium* P13, de su hipotético gen de inmunidad (*entiP*) y de las regiones adyacentes. Identificación de las regiones relacionadas con el inicio de la transcripción y de la traducción

```

1  CTCAGTATTTGTCACACAAAAATTCGAAAAATATTCTATAGCTTTATAGAAGGGCCAACA
61  ACTTTTAAGGTTTGTATCCTGTTTTAATTTCTCATTTACGCGTTCCTTCAATAGTTCACT
                                     S.D. -35
121  TAATTAAGTTCAGATAGATATAAAATTAGATCTCAATAGGGTATACTCCAGAAATGGAAG
                                     -10 orfX M E E
181  AATATGAAAATCAAGTAGCAAAATATTTGAGAAAAGTAGGAAATTATGCGCGTTATTGTG
      Y E N Q V A K Y L R K V G N Y A R Y C V
241  TGACACACGATTTTCTAGGGAATGAATTAATTCCTCCGAAGAATACAAATGAGATTAGTTT
      T H D F L G N E L I P R R I Q M R L V L
                                     SRDi SRDli SRDld SRD2i
301  TAACAATGATTTTTTATTGCCATTATGCTTTCAAAACAACGTATTATGATATAATTATCA
      T M I F Y C H Y A F K T T V Y D I I I-35K
                                     SRId SRD2d S.D.
361  AATTTTTCTAAAAATCATTTATAATTATTTTAGAAAAAGGAGGTATTGATTTATGAGAAA
      F F * -10 entP M R K
421  AAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGGAATATTTGGGTTAGTTGTGACAAATTTGGTAC
      K L F S L A L I G I F G L V V T N F G T
481  AAAAGTTGATGCAGCTACGCGTTCATATGGTAATGGTGTATTATTGTAATAATAGTAAATG
      K V D A A T R S Y G N G V Y C N N S K C
541  CTGGGTTAACTGGGGAGAAGCTAAAGAGAATATTGCAGGAATCGTTATTAGTGGCTGGGC
      W V N W G E A K E N I A G I V I S G W A
                                     S.D.
601  TTCTGGTTTGGCAGGTATGGGACATTAATACTATGAAAAGTAATAAATCTTTCAACAAAG
      S G L A G M G H * entIP M K S N K S F N K V
661  TTCTAGAATTAAGTGAACAGCATTAGCCACCCAGAAATTAAAAAAGATAAAAAATCTAT
      L E L T E T A L A T P E I K K D K N L C
721  GTGAAATTTTAGAAAAAGTAAAAGCTAGTGCTGCTAAAGGTGAATTTTATTATGATTACA
      E I L E K V K A S A A K G E F Y Y D Y K
781  AGAAAGAATTTCAACCTGCAATTAGTGGATTCACTATTAGAAACGGCTTTTCCACACCGA
      K E F Q P A I S G F T I R N G F S T P K
841  AGGTTTTATTGGAGTTGCTTGCTGAAGTAAAAACTCCCAAAGCATGGTCGGGACTTTGAG
      V L L E L L A E V K T P K A W S G L *
901  TTATGATAAGTGCCATTCTATTTTTTTGTAAGAGTATCTAATTGAGTTTTTAAGGAACATAT
961  GGAATATAGAAATTAAAAATGTTACAATATATTTGG 995

```

Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8. Los dextrirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.15. Los números indican la posición de las bases nitrogenadas en pares de bases. ATG: codón de iniciación de la traducción correspondiente al aminoácido metionina; *, codones de terminación de la traducción (UAA, UGA). Las regiones -35 y -10 de los hipotéticos promotores y las secuencias Shine-Dalgarno (S.D.) se han subrayado. Los 2 juegos de secuencias repetidas directas (SRDi, izquierda; SRDd, derecha) se han suprayado y las secuencias repetidas inversas (SRli y SRId) se muestran en cursiva. El punto de procesamiento de la bacteriocina está señalado con una flecha vertical.

Figura 4.13. Secuencia aminoacídica de la enterocina P de *E. faecium* P13 obtenida por degradación de Edman y por secuenciación genética

| | | | | | | | |
|------------------------|-----|---------|----------------------|----|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-----|
| Degradación de Edman | | | | +1 | XTRSYGNGVYCNSKCVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMG? | +44 | |
| Secuenciación genética | -27 | MRKKLFS | LALIGIFGLVVTNFGTKVDA | -1 | ↓ +1 | ATRSYGNGVYCNSKCVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH | +44 |

Código monosílabo de los aminoácidos y símbolos como en la Figura 4.8. Los aminoácidos en cursiva no se pudieron determinar por degradación de Edman o su identificación no coincidió con la deducida de la secuencia genética. El punto de procesamiento de la preproenterocina P se indica con una flecha vertical. Los números negativos indican los límites de la extensión N-terminal de la preproenterocina P y los números positivos corresponden a la bacteriocina. La secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina se ha subrayado.

delante de la región -35, se denominó SRD1 derecha (SRD1d), mientras que la secuencia TTATGCTTT, localizada 12 pb delante de la SRD1d, se denominó SRD1 izquierda (SRD1i). El segundo juego de SRD (SRD2) consiste en dos secuencias idénticas de 9 pb (TATAATTAT), separadas por una región de 21 pb rica en A+T. Las SRD2 se solapan parcialmente con las regiones -10 y -35 del promotor. La SRD2 derecha (SRD2d) incluye el hexámero correspondiente a la región -10 y los tres nucleótidos posteriores (TATAATTAT) y la SRD2 izquierda (SRD2i), localizada 21 pb delante de la SRD2d, incluye 4 nucleótidos del extremo 5' de la región -35 y los 5 nucleótidos anteriores (TATAATTAT). Las secuencias repetidas inversas (SRI) consisten en dos secuencias de 10 pb ricas en A+T. La SRI derecha (SRId), de secuencia AAAAATCATT, se localiza inmediatamente delante de la región -10 del promotor de *entP*. La SRI izquierda (SRIi), de secuencia AATGATTTTT, se localiza 55 pb delante de la SRId. En los procariotas, inmediatamente después de la transcripción acontece la traducción en los ribosomas del ARNm recién transcrito. En la región del ARNm que se encuentra entre su extremo 5' y el triplete o codon de iniciación de la traducción (AUG, UUG o GUG), conocida como región 5' no traducida, se localiza la secuencia de unión al ribosoma (RBS, del inglés *Ribosome Binding Site*) o secuencia Shine-Dalgarno (S.D.). La secuencia S.D. consiste en un nanómero rico en purinas cuya secuencia consenso (5'-UAAGGAGGU-3', el caso de *E. coli*) es complementaria al extremo 3' del ARNr-16S (3'-AUUCCUCCA-5') (Shine y Dalgarno, 1974). La secuencia S.D. y el codon de iniciación de la traducción están separados por una región de 2-10 pb (consideradas desde el núcleo AGGA de la secuencia S. D. hasta el primer nucleótido del codon de iniciación). En este contexto, el análisis de la región nucleotídica localizada delante de *entP* permitió identificar una secuencia S. D. altamente conservada (AAGGAGGU), que se encuentra a una distancia óptima de 11 pb del codon de iniciación de la traducción (AUG) de la pre-enterocina P.

El ORF localizado en el extremo 3' del fragmento secuenciado de 955 pb se denominó *entiP* (Figuras 4.12 y 4.14). El codon de iniciación (AUG) de *entiP* se encuentra sólo 4 nucleótidos detrás (*downstream*) del codon de terminación (UAA) del gen estructural de la enterocina P y, por otra parte, a la distancia óptima de 10 pb del codon de iniciación de *entiP* se localiza una posible secuencia S.D. (GGGA). *EntiP* codifica presumiblemente una proteína (ENTIP) de 88 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de 9.886 Da (Tabla IV.16). La comparación de la secuencia aminoacídica de esta proteína con las de los bancos de datos SWISS-PROT, SWISS-NEW, TREMBLNEW, PDB-PROTEIN y PIR reveló que se trataba de una nueva proteína y permitió hipotetizar que es la proteína responsable de la inmunidad de *E. faecium* P13 a la enterocina P.

El ORF localizado en el extremo 5' del fragmento secuenciado de 955 pb se denominó *orfX* y su codon de iniciación (AUG) se encuentra a 41 pb del codon de iniciación del gen estructural de la enterocina P, solapando parcialmente con la región -35 de su promotor (Figuras 4.12 y 4.14). El análisis de la región nucleotídica localizada delante de *orfX* permitió localizar una posible secuencia S.D. (AGGG), situada a una distancia óptima de 12 pb del codon de iniciación de *orfX*. Asimismo, se identificaron, separadas por una distancia óptima de 18 pb, las secuencias -10 (TATAAA) y -35 (TTCAC) del hipotético promotor de *orfX*. *OrfX* codifica presumiblemente una proteína (ORFX) de 65 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de

7.978 Da (Tabla IV.16). El análisis informático de esta proteína con el programa PHYSCHEM reveló que se trataba de una proteína estable, catiónica (carga neta 3, a pH 7,0), con un elevado pI (9,2) e hidrófoba (Índice GRAVY de -0,04). De acuerdo con el programa SOAP (Klein *et al.*, 1985) se trata de una proteína periférica que carece de segmentos transmembrana; no obstante, el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984) predijo una posible hélice α transmembrana (PTH) de 21 residuos, entre las posiciones 42 (Val) y 62 (Ile). La comparación de la secuencia aminoacídica de ORFX con las de otras proteínas de las bases de datos indicadas anteriormente no permitió encontrar ninguna homología significativa.

En la Figura 4.14 se muestra la organización genética y el mapa parcial de restricción del fragmento de 995 pb del ADN de *E. faecium* P13 que contiene el gen estructural de la enterocina P (*entP*), el gen correspondiente a su hipotética proteína de inmunidad, ENTIP, (*entiP*) y el *orfX*.

La secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P, de su hipotético gen de inmunidad y de las regiones adyacentes se encuentra registrada en la base de datos GENBANK con el número de acceso AF005726.

IV.10.5. Análisis de la secuencia aminoacídica de la enterocina P, de su extensión N-terminal y de su hipotética proteína de inmunidad. Parámetros físico-químicos

La secuencia aminoacídica de la enterocina P deducida de la secuencia genética de su correspondiente gen estructural coincide con la obtenida por degradación de Edman, y permite determinar la presencia del aminoácido alanina en su extremo N-terminal (Ala1) y, asimismo, confirmar la existencia de un residuo de histidina en su extremo C-terminal (His44), por lo que la enterocina P madura contiene 44 residuos aminoacídicos (Figura 4.13). El análisis de su secuencia aminoacídica reveló que esta bacteriocina contiene en su extremo N-terminal, entre las posiciones 5 y 9, la secuencia consenso YGNGV característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina (sección II.4.1). Los principales parámetros físico-químicos de la enterocina P se muestran en la Tabla IV.16, en la que se observa que la molécula contiene un 18% de residuos de glicina, un 41% de aminoácidos apolares (de los cuales el 11% son residuos aromáticos), un 27% de aminoácidos polares neutros y el 5 y el 9% restante lo constituyen aminoácidos ácidos y básicos, respectivamente. La enterocina P es una proteína estable, periférica, catiónica (carga neta 1, a pH 7,0), de elevado pI (8,3), hidrófoba (índice GRAVY de -1,50) y con un tamaño molecular teórico de 4.630 Da. El extremo N-terminal (hasta el residuo 22) es poco hidrófobo (índice GRAVY de -8,46), mientras que la región C-terminal de la molécula es muy hidrófoba (índice GRAVY de +5,45) y, según el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984), contiene una posible hélice α transmembrana (PTH) de 21 aminoácidos, entre los residuos 23 (Ala) y 43 (Gly) (índice GRAVY de +7,23).

El análisis de la extensión N-terminal de 27 aminoácidos de la enterocina P (Figura 4.13) permitió identificar las siguientes regiones: (i) tres residuos aminoacídicos con carga neta positiva inmediatamente después del extremo N-terminal, en las posiciones -26 (R), -25 (K) y -24 (K), los cuales conforman la región hidrofílica (índice GRAVY de -41) denominada "dominio N"; a

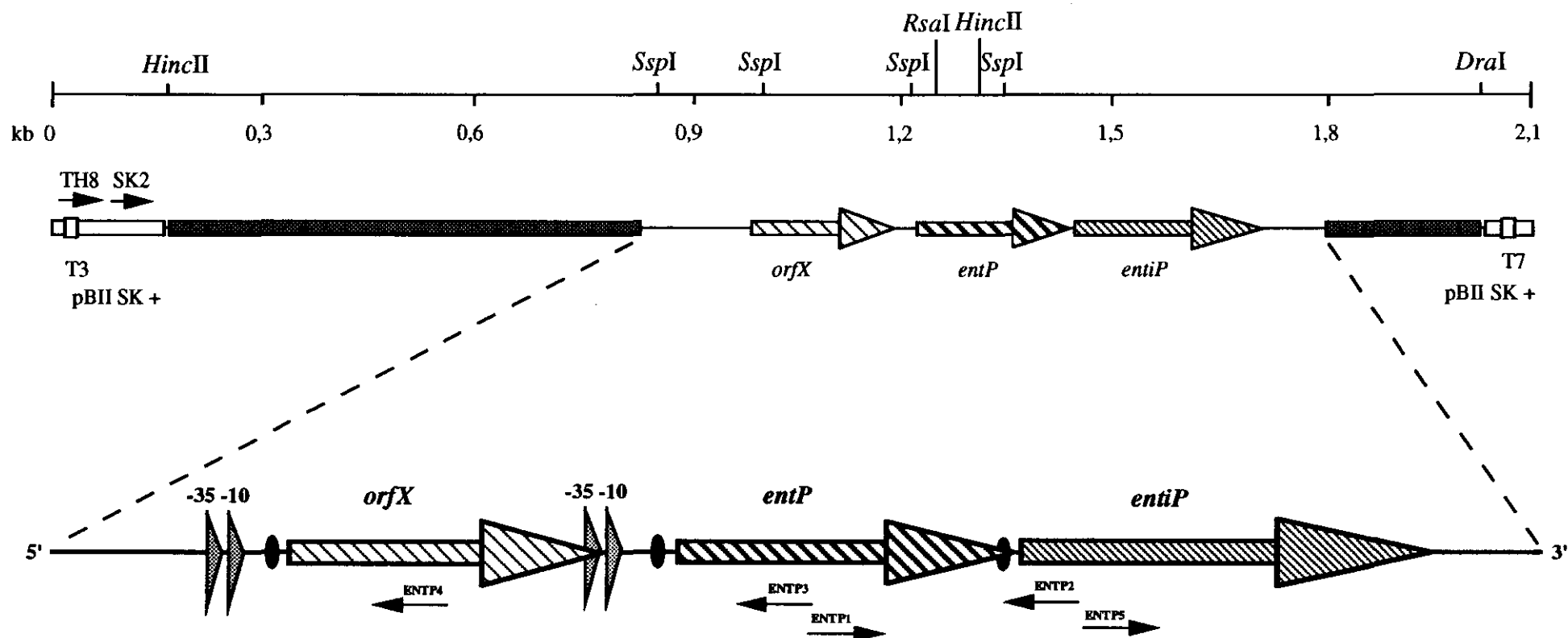


Figura 4.14. Organización genética y mapa parcial de restricción del fragmento de 995 nucleótidos del ADN de *E. faecium* P13 que contiene el gen estructural de la enterocina P (*entP*), su hipotético gen de inmunidad (*entiP*) y el *orfX*.

La línea superior muestra la escala en Kb empleada en la realización de esta figura y la localización en el fragmento de dianas de diversos enzimas de restricción. La parte central de la figura representa la localización de una región de 1.875 pb que contiene el fragmento secuenciado en el vector de ligación pBluescript II SK + (pBIISK+). El vector se muestra como regiones rectangulares blancas en las que se indica la posición relativa de los promotores T3 y T7 (rectángulos blancos verticales) y de los cebadores SK2 y TH8 específicos del vector (flechas negras orientadas en dirección 3'). La región secuenciada se representa como una línea en la que *entP*, *entiP* y *orfX* aparecen como flechas rayadas orientadas en dirección 3'. Las regiones rectangulares sombreadas adyacentes al fragmento de 995 pb representan ADN de *E. faecium* P13 no secuenciado. La parte inferior de la figura representa una ampliación del fragmento secuenciado en la que se muestran las hipotéticas secuencias Shine-Dalgarno (S.D.) (óvalos negros), las secuencias -35 y -10 de los hipotéticos promotores de *entP* y *entiP* (triángulos punteados) y la localización y orientación de los cebadores empleados durante su secuenciación (flechas negras).

Tabla IV.16. Parámetros físico-químicos de la enterocina P de *E. faecium* P13, de su extensión N-terminal (péptido señal), de su hipotética proteína de inmunidad (ENTIP) y de ORFX

| | Pm (Da) | Nº aa | % de aminoácidos | | | | | | Aminoácidos ausentes | Carga neta ^a | pI | Índice GRAVY | Nº PTHs |
|---------------|------------|----------|------------------|----------|----|---------|----|----|----------------------|----------------------------|------|-----------------|------------|
| | | | Gly | apolares | | polares | | | | | | | |
| | | | | Af | Ar | Nt | Ac | Bs | | | | | |
| ENTEROCINA P | 4.630 | 44 | 18 | 30 | 11 | 27 | 5 | 9 | P, F, Q, D | 1 | 8,3 | -1,50 | 1 |
| PÉPTIDO SEÑAL | 2.940 | 27 | 11 | 44 | 11 | 15 | 4 | 15 | P, W, Y, Q, C, E, H | 3 | 11,1 | +8,92 | 1 |
| ENTIP | 9.886 | 88 | 5 | 35 | 10 | 20 | 13 | 17 | H | 4 | 9,8 | -3,56 | 0 |
| ORFX | 7.978 | 65 | 3 | 35 | 19 | 17 | 9 | 17 | W, S | 3 | 9,2 | -0,04 | 1 |

^aCarga neta a pH 7.0. Símbolos y abreviaturas: Nº aa, número de aminoácidos; Ar, residuos apolares aromáticos; Af, residuos apolares alifáticos; Sf, residuos apolares sulfurados; Nt, residuos polares neutros; Ac, residuos polares ácidos; Bs, residuos polares básicos; pI, punto isoelectrico; Índice GRAVY, valor promedio hidropático; Nº PTH, número de posibles hélices α transmembrana. Código monosílaba de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

continuación, (ii) una región, desde L (-23) hasta F (-7), ambos inclusive, constituida por 12 aminoácidos hidrófobos, 3 residuos polares sin carga neta y 2 glicinas, que conforman el núcleo hidrofóbico (índice GRAVY de +21,29) o “dominio H”, en el que se encuentra una posible hélice α transmembrana (PTH) y, por último, (iii) una región menos hidrófoba (índice GRAVY de -4,2), denominada “dominio C”, formada por 6 aminoácidos (desde G-6 hasta A-1, ambos inclusive), de los que destacan 2 residuos hidrófobos, no aromáticos y de pequeño tamaño molecular en las posiciones -3 (Val-3) y -1 (Ala-1), con respecto al punto de procesamiento de la preproenterocina P. Estas características de la extensión N-terminal de la enterocina P concuerdan con la “regla del -3-1” y con los demás criterios establecidos por Von Heijne (1983, 1986) (sección II.4.6) para los péptidos señal que dirigen la secreción de proteínas a través de la Ruta General de Secreción (GSP) dependiente del péptido señal (sistema *sec*-dependiente), en la que intervienen los productos de los genes *sec* y las peptidasas de señal (Gierasch, 1989; Wandersman, 1992; Pugsley, 1993). Los parámetros físico-químicos más relevantes del péptido señal de la enterocina P se muestran en la Tabla IV.16, en la que se observa que el 11% de la molécula está constituido por residuos de glicina, el 55% corresponde a aminoácidos apolares (de los cuales el 11% son residuos aromáticos), el 15% a aminoácidos polares neutros y el 19% restante contiene aminoácidos polares cargados (4% ácidos y 15% básicos). La molécula es estable, catiónica (carga neta 3, a pH 7,0), de elevado pI (11,1), muy hidrófoba (índice GRAVY de +8,92) y con un tamaño molecular teórico de 2.940 Da. De acuerdo con el programa SOAP (Klein *et al.*, 1985) se trata de una proteína integral y, al igual que predice el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984), posee una hélice α transmembrana (PTH) de 17 aminoácidos, entre los residuos aminoacídicos correspondientes a las posiciones -23 (Leu) y -7 (Phe).

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede concluir que la enterocina P de *E. faecium* P13 es una nueva bacteriocina *sec*-dependiente del tipo pediocina, es decir, una sustancia antimicrobiana que se sintetiza en los ribosomas en forma de un prepropéptido o precursor inactivo (preproenterocina P) que contiene un péptido señal que lo dirige a la membrana plasmática y que se procesa concomitantemente con la secreción del péptido activo o maduro (enterocina P), que contiene la secuencia consenso YGNGV, a través de la Ruta General de Secreción (GSP).

La hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P contiene 88 aminoácidos y un tamaño molecular teórico de 9.886 Da. Del análisis de su secuencia aminoacídica (Figura 4.12) se desprende que esta proteína carece de una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) lo que la diferencia de la enterocina P y de la mayoría de las bacteriocinas descritas. Los parámetros físico-químicos de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P se muestran en la Tabla IV.16, de la que se deduce que el 5% lo constituyen residuos de glicina, el 45% son aminoácidos apolares (10% residuos aromáticos), el 20% son residuos polares neutros y el 30% restante lo constituyen residuos polares cargados (13% de residuos aminoacídicos ácidos y 17% de residuos aminoacídicos básicos). La molécula es periférica, estable, catiónica (carga neta 4, a pH 7,0), de elevado pI (9,8) e hidrófoba (índice GRAVY de -3,56). De acuerdo con los programas HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984) y SOAP (Klein *et al.*, 1985), la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P no contiene segmentos transmembrana.

IV.11. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE LA ENTEROCINA B DE *E. faecium* T136

IV.11.1. Purificación a homogeneidad y determinación de la secuencia aminoacídica parcial de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136

La purificación de las sustancias antimicrobianas se llevó a cabo a partir del sobrenadante libre de células obtenido por centrifugación de dos cultivos de *E. faecium* T136 (inóculo del 0,01%) desarrollados en frascos con 500 ml de caldo MRS a 32°C durante 16 horas. En primer lugar se precipitaron las proteínas del sobrenadante con sulfato amónico y, posteriormente, se aplicaron las técnicas cromatográficas de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase reversa según el protocolo descrito en la sección III.2.10.3.3. La actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se detectó y cuantificó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4), empleando como microorganismo indicador *E. faecium* P13.

Los resultados globales de la purificación de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* T136 se muestran en la Tabla IV.17, en la que aparecen, entre otros parámetros, el incremento de la actividad antimicrobiana específica y la recuperación de la actividad antimicrobiana en cada una de las etapas del proceso de purificación. La actividad antimicrobiana inicial detectada en el sobrenadante libre de células (fracción I) fue de 555 UB/ml. La precipitación de las proteínas del sobrenadante con sulfato amónico (500 g/l) permitió concentrar las sustancias antimicrobianas en un volumen de 200 ml (fracción II) con una recuperación del 77% y con un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 6 veces. La fracción II se aplicó a una columna de intercambio catiónico (SP-Sepharose), eluyéndose la fracción III, que mostró un incremento de actividad antimicrobiana específica de 471 veces y una recuperación del 31%. Esta fracción se aplicó a una columna de interacción hidrofóbica (Octyl-Sepharose CL4B), eluyéndose con una solución de alcohol etílico al 70% (v/v) la fracción IV, cuya actividad antimicrobiana representaba el 30% de la del sobrenadante y cuya actividad antimicrobiana específica fue 1.323 veces superior a la inicial. La fracción IV eluida de la columna de interacción hidrofóbica se aplicó a una columna de fase reversa (PepRPC HR5/5) integrada en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) obteniéndose el cromatograma de la Figura 4.15. Como se observa en esta figura, al principio de la cromatografía eluyeron unas sustancias que no mostraron actividad antimicrobiana y cuando el gradiente de 2-propanol fue de un 28-34% se obtuvieron dos fracciones con actividad antimicrobiana (fracciones 7 y 8). Las fracciones que eluyeron a continuación carecieron de actividad inhibidora y cuando el gradiente de 2-propanol alcanzó el 40% apareció un pico de absorbancia, correspondiente a la fracción 11, que volvió a mostrar actividad antimicrobiana. En base a estos resultados, la mezcla de las fracciones 7 y 8 y la fracción 11 se recromatografiaron independientemente en la misma columna bajo condiciones similares, pero empleando un gradiente de elución más lento para lograr así una mejor separación de las sustancias proteicas.

Tras la cromatografía de fase reversa de las fracciones 7 y 8 se obtuvo el cromatograma de la Figura 4.16, en el que se observa nuevamente la presencia de dos picos de actividad

Tabla IV.17. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares producidas por *E. faecium* T136

| | Volumen (ml) | Absorbancia total ₂₅₄ ^a | Actividad total (UB) ^b | Actividad específica ^c | Incremento en la actividad específica ^d | Recuperación (%) |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| Sobrenadante (Fracción I) | 1.000 | 33.400 | 555.800 | 16 | 1 | 100 |
| Precipitación con sulfato amónico (Fracción II) | 200 | 4.340 | 429.640 | 99 | 6 | 77 |
| Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción III) | 50 | 23 | 173.315 | 7.535 | 471 | 31 |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción IV) | 10 | 8 | 169.353 | 21.169 | 1.323 | 30 |
| Cromatografía de fase reversa | | | | | | |
| Fracción A1 | 0,9 | 0,041 | 4.942 | 120.536 | 7.533 | 0,8 |
| Fracción A2 | 1,1 | 0,058 | 10.734 | 185.069 | 11.567 | 2 |
| Fracción A3 | 1,8 | 0,123 | 2.723 | 22.138 | 1.384 | 0,4 |

^aAbsorbancia total₂₅₄, absorbancia a 254 nm multiplicada por el volumen en mililitros. ^bActividad antimicrobiana total (UB), recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el desarrollo de *E. faecium* P13, multiplicado por el volumen en mililitros. ^cActividad antimicrobiana específica, actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A total₂₅₄; ^dActividad antimicrobiana específica de la fracción correspondiente dividida por la del sobrenadante.

antimicrobiana. El primer pico corresponde a las fracciones 5, 6 y 7 y el segundo coincide con el pico de absorbancia de la fracción 11. Las fracciones 5, 6 y 7 se mezclaron y se recromatografiaron de nuevo, obteniéndose el cromatograma de la Figura 4.17, en el que se observa que a una concentración de 2-propanol del 26% eluyó un pico de absorbancia mayoritario (fracción 10) que mostró actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de esta fracción (fracción A1, Tabla IV.17) representó una recuperación del 0,8% y su actividad antimicrobiana específica fue 7.533 veces superior a la del sobrenadante. Asimismo, la fracción 11 (Figura 4.16) se recromatografió y se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 4.18, en el que se observa que a una concentración de 2-propanol del 27% eluyó un pico de absorbancia mayoritario (fracción 11) que mostró actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de esta fracción (fracción A2, Tabla IV.17) representó una recuperación del 2% y su actividad antimicrobiana específica fue 11.567 veces superior a la del sobrenadante.

Finalmente, se cromatografió de nuevo la fracción 11 (Figura 4.15), obteniéndose el cromatograma que se muestra en la Figura 4.19. Como puede observarse, el pico de actividad antimicrobiana coincidió con el pico de absorbancia mayoritario (fracción 5), que eluyó a un 40% de 2-propanol. La actividad antimicrobiana de esta fracción (fracción A3, Tabla IV.17) representó un 0,4% con respecto a la del sobrenadante y su actividad antimicrobiana específica fue 1.384 veces superior a la inicial.

La concentración de proteína de las muestras purificadas se determinó según el procedimiento descrito en la sección III.2.10.3.5, resultando que las fracciones A1, A2 y A3 tenían una concentración de proteína de 40, 15 y 11 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Por lo tanto, la cantidad total de proteína A1, A2 y A3 obtenida tras el proceso de purificación fue de 36; 16,5 y 19,8 μg , respectivamente.

Para determinar si las tres fracciones obtenidas contenían bacteriocinas diferentes o si, por el contrario, eran distintas formas moleculares de la misma sustancia proteica, se determinó su secuencia aminoacídica mediante degradación de Edman (sección III.2.10.5). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1) La fracción A1 contenía una única proteína, de la que sólo se pudieron determinar los primeros 18 residuos de su extremo N terminal (Xaa-Thr-His-Ser-Gly-Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-Xaa-Thr-Lys-Asn-Lys; donde Xaa representa un residuo aminoacídico no identificado). Esta secuencia aminoacídica se comparó con las de los bancos de datos SWISS-PROT, SWISS-NEW, TREMBLNEW, PDB-PROTEIN y PIR y resultó ser idéntica al extremo N-terminal de la enterocina A producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

- 2) La fracción A2 contenía una mezcla de las fracciones A1 y A3.

- 3) La fracción A3 estaba constituida por una única proteína, de la que sólo se pudieron determinar los primeros 19 residuos de su extremo N-terminal (Xaa-Asn-Xaa-His-Xaa-Met-Pro-Asn-Glu-Leu-Asn-Arg-Pro-Asn-Asn-Leu-Ser-Lys-Gly). Esta secuencia aminoacídica se comparó con las secuencias de otras bacteriocinas de los bancos de datos indicados anteriormente, no encontrándose identidad con ninguna de ellas. Así, pues, se trata de una nueva bacteriocina producida por *E. faecium* T136, que se denominó enterocina B.

Con el objeto de disponer de una mayor cantidad de enterocina B para poder determinar su

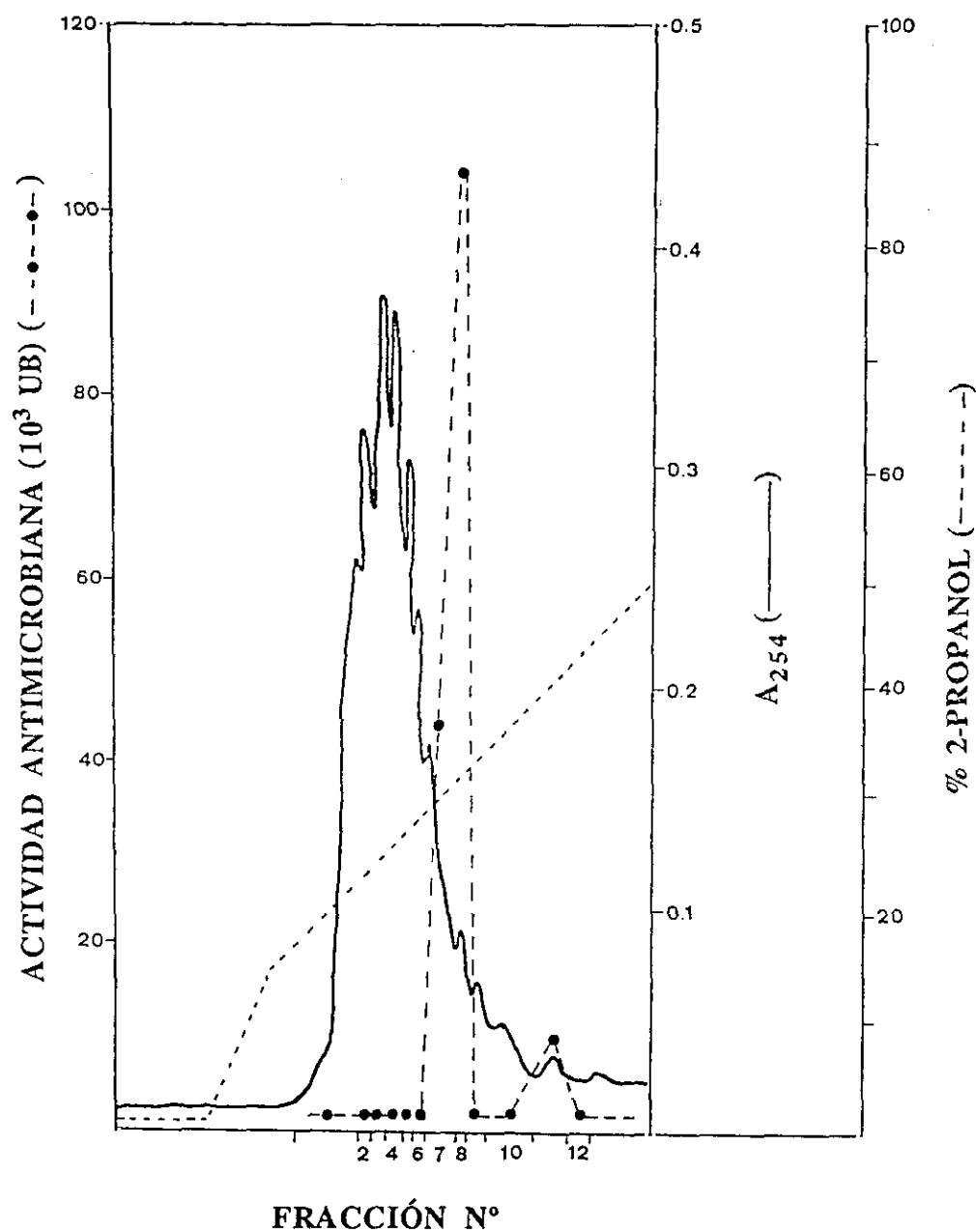


Figura 4.15. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (fracción IV; Tabla IV.17). Las fracciones con actividad inhibidora (fracciones 7 y 8 y fracción 11) se recromatografiaron bajo condiciones similares.

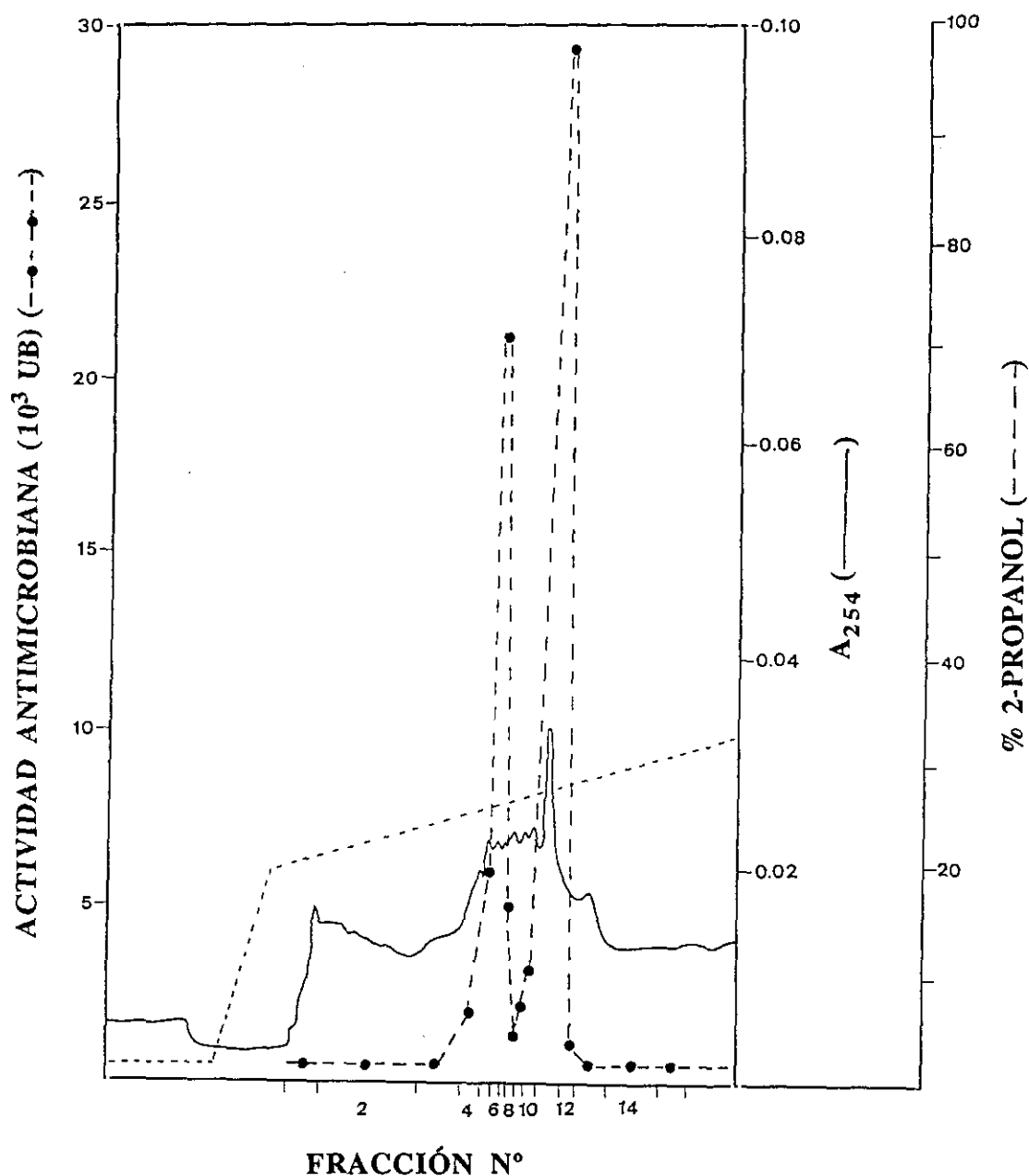


Figura 4.16. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de las fracciones 7 y 8 de la Figura 4.15. Las fracciones con actividad inhibidora (fracciones 5, 6 y 7 y fracción 11) se recromatografiaron bajo condiciones similares.

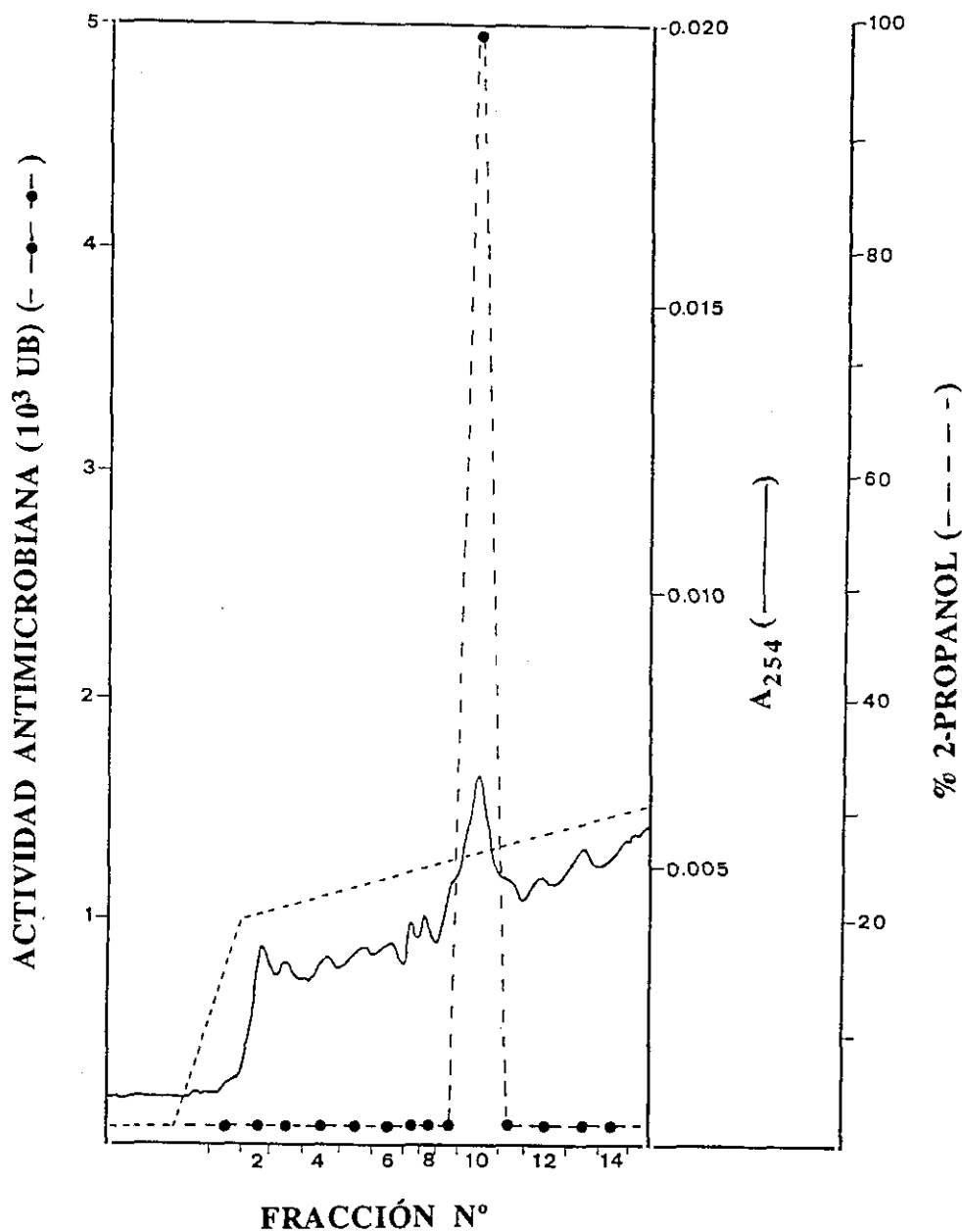


Figura 4.17. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de las fracciones 5, 6 y 7 de la Figura 4.16.

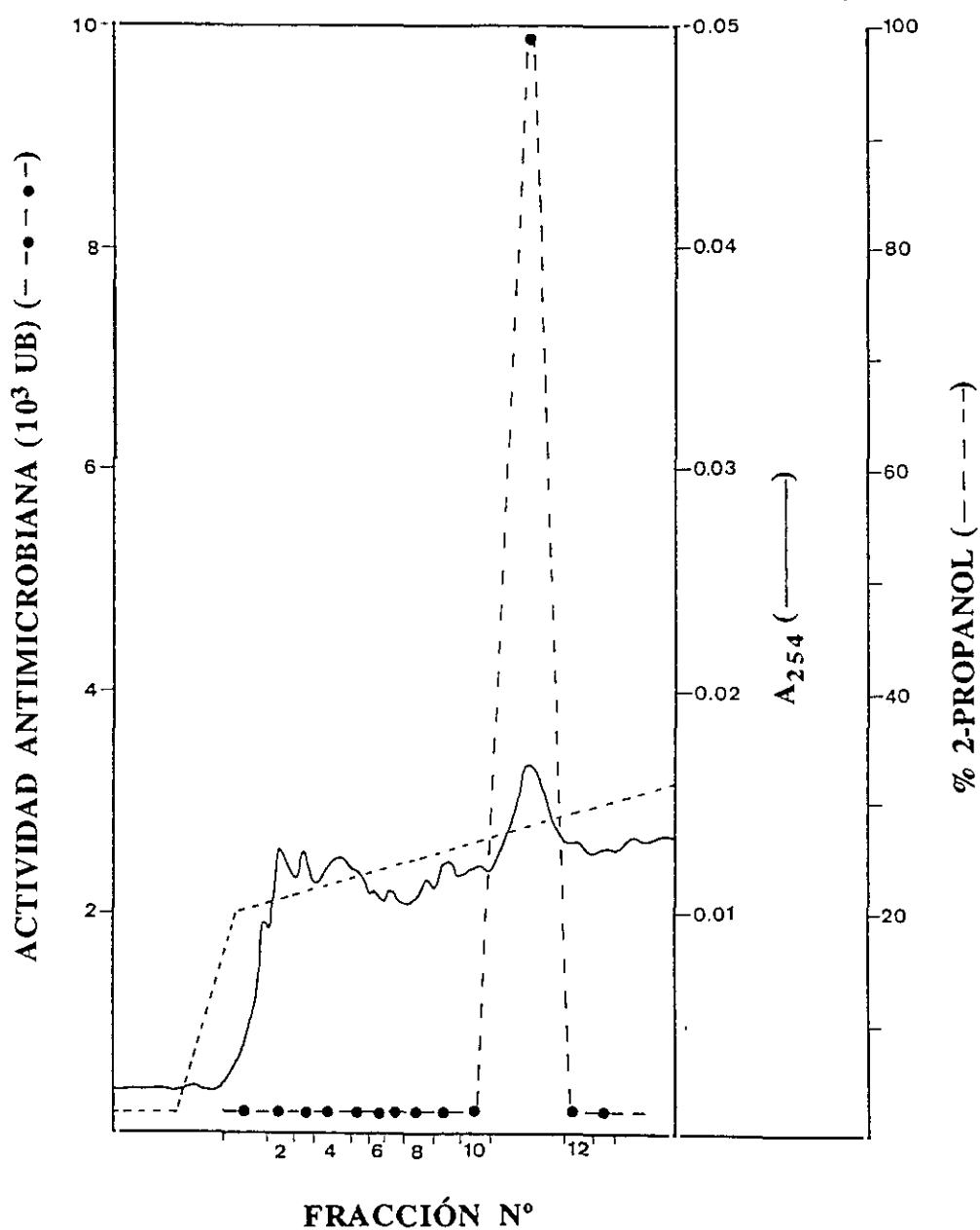


Figura 4.18. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa de la fracción 11 con actividad inhibidora de la Figura 4.16.

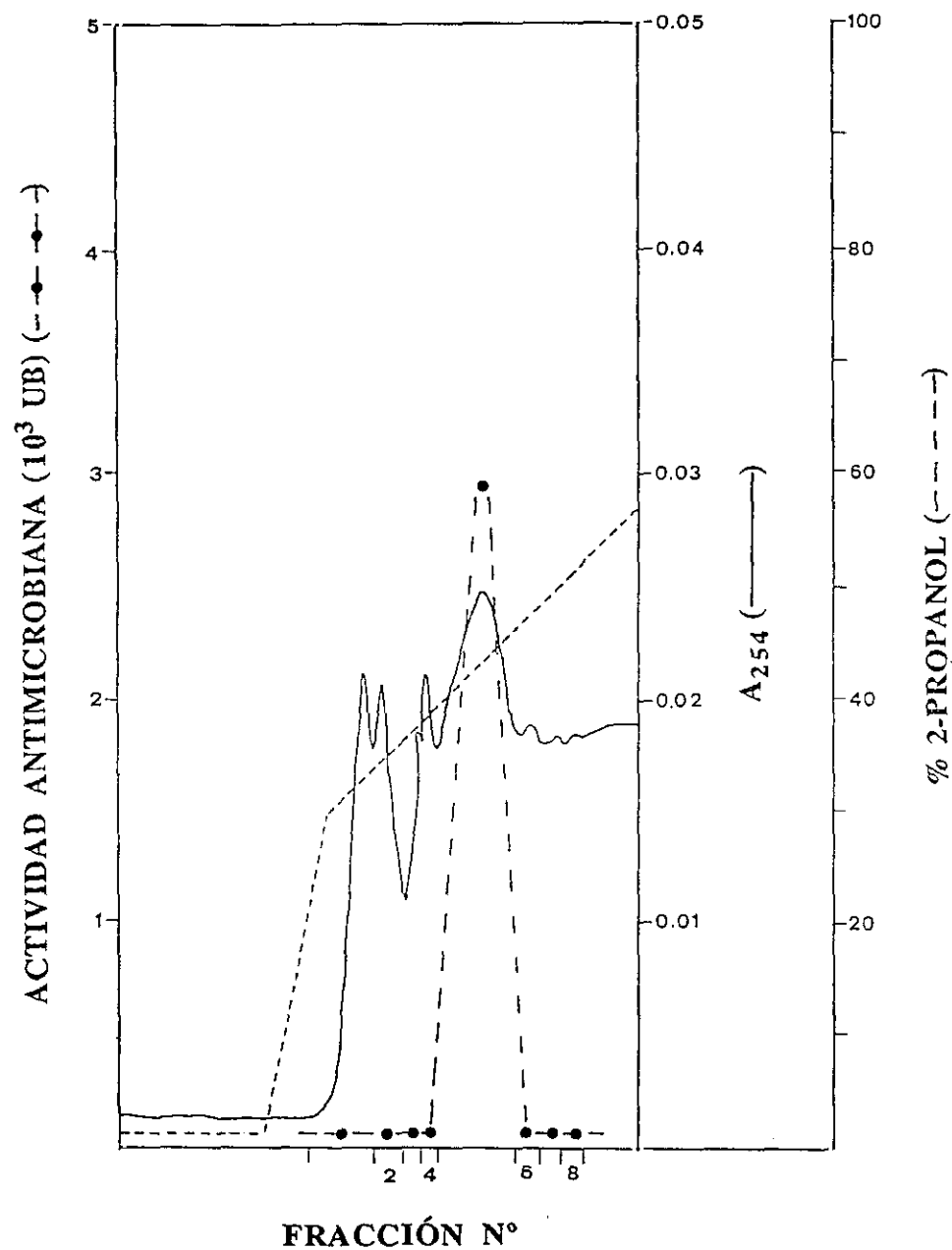


Figura 4.19. Purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de la fracción 11 de la Figura 4.15.

composición y su secuencia aminoacídica completa, así como su masa molecular por espectrometría de masas, se procedió a optimizar la producción de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136.

IV.11.2. Optimización de la producción y purificación a homogeneidad de la enterocina B y de la enterocina A

Como paso previo a la optimización de la producción y a la purificación a homogeneidad de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136, se seleccionaron microorganismos sensibles a cada una de ellas para, de este modo, poder cuantificar la actividad antimicrobiana de cada bacteriocina independientemente mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4).

En primer lugar se seleccionaron *E. faecium* P13, *Lb. sake* 148 y *P. pentosaceus* FBB61, ya que eran sensibles a la actividad antimicrobiana del sobrenadante de *E. faecium* T136 (Tablas IV.2, IV.3 y IV.4), es decir, sensibles a la enterocina B y/o a la enterocina A. A continuación, se determinó su sensibilidad a la enterocina B y a la enterocina A purificadas a homogeneidad. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a *Lb. sake* 148 como un microorganismo indicador idóneo para detectar la presencia de la enterocina B, ya que resultó muy sensible a esta bacteriocina y, por el contrario, fue resistente a la enterocina A. Asimismo, se seleccionó a *P. pentosaceus* FBB61 como microorganismo indicador para detectar la presencia de la enterocina A, pues era inhibido por esta bacteriocina pero no por la enterocina B (sección IV.11.7).

IV.11.2.1. Optimización de la producción de la enterocina B y de la enterocina A

Para optimizar la producción de las enterocinas B y A, *E. faecium* T136 (inóculo del 0,1%) se desarrolló anaeróbicamente en caldo MRS a 30°C con agitación constante (50rpm) en un fermentador, manteniendo constante el pH del medio de cultivo (6,2; 5,7 y 5,2), durante 24 ó 63 h (sección III.2.10.4.1). Durante la incubación de los cultivos se monitorizó el consumo de glucosa y se tomaron muestras periódicamente para determinar su absorbancia a 620 nm y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes correspondientes. La producción de enterocina B y de enterocina A durante las fermentaciones controladas se determinó de forma indirecta, evaluando la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes frente a *Lb. sake* 148 y *P. pentosaceus* FBB61 mediante un ensayo en placas microtituladoras.

En la Figura 4.20 se muestran las cinéticas del crecimiento y de la producción de enterocinas B y A, así como el consumo de glucosa, cuando *E. faecium* T136 se desarrolló en el fermentador con el pH constante a 6,2 y 5,7 durante 24 h y con el pH constante a 5,2 durante 63 h.

A pH 6,2 (Figura 4.20A), la cinética de producción de las enterocinas B y A fue similar, comenzando a detectarse la actividad antimicrobiana al inicio de la fase exponencial de crecimiento (tras 5 horas de incubación en el caso de la enterocina A y después de 6 horas en el caso de la enterocina B). La máxima actividad antimicrobiana de la enterocina A se alcanzó hacia la mitad de la fase exponencial (12 horas), mientras que en el caso de la enterocina B se detectó al final de la misma (15 horas). La actividad antimicrobiana máxima de la enterocina A (1.822.000 UB totales) representó únicamente un 25% de la cuantificada para la enterocina B (7.208.000 UB totales). La actividad antimicrobiana de las dos bacteriocinas disminuyó progresivamente durante la incubación, detectándose al final de la fase estacionaria 325.000 UB totales de

enterocina A y 1.201.400 UB totales de enterocina B, lo que representa un 17 y un 18%, respectivamente, de la actividad antimicrobiana máxima. En lo que respecta al consumo de glucosa durante el desarrollo de *E. faecium* T136, en las 12 primeras horas de incubación se metabolizó el 51% de la glucosa (41 g) y a las 15 h -final de la fase exponencial del crecimiento- ya se había metabolizado el 86% (69,1 g). Durante las últimas 9 h de incubación sólo se fermentaron 2,9 g de glucosa, lo que significa que finalizada la incubación se había metabolizado el 90% de la glucosa (72 g).

A pH 5,7 (Figura 4.20B), la producción de enterocinas B y A mostró una cinética similar a la descrita en el caso anterior, comenzándose también a detectar la actividad antimicrobiana al inicio de la fase exponencial de crecimiento (tras 6 horas de incubación en el caso de la enterocina A y después de 7 horas en el caso de la enterocina B). Asimismo, los valores máximos de actividad antimicrobiana de la enterocina A y de la enterocina B se alcanzaron hacia la mitad de la fase exponencial (14 horas) y en el final de la misma (20 horas), respectivamente. La actividad antimicrobiana máxima de la enterocina A fue de 2.228.000 UB totales, es decir, un 29% de la detectada para la enterocina B (7.716.000 UB totales). Así, pues, manteniendo el pH del cultivo a 5,7 aumentó la producción de enterocina B en un 7%, con respecto a los valores obtenidos a pH 6,2, mientras que en el caso de la enterocina A la producción se aumentó en un 22%. Asimismo, las dos bacteriocinas fueron mucho más estables a pH 5,7, ya que una vez alcanzados los valores máximos de producción, la actividad antimicrobiana se mantuvo constante durante toda la fase estacionaria, detectándose al final de la misma un 99% (7.660.000 UB totales) de la actividad antimicrobiana máxima de la enterocina B y un 77% (1.722.000 UB totales) en el caso de la enterocina A. A diferencia de lo que sucedió con la actividad antimicrobiana, el crecimiento de *E. faecium* T136 a pH 5,7 fue menor y más lento que a pH 6,2, prolongándose la fase exponencial de crecimiento hasta las 20 h de incubación. La tasa de fermentación de la glucosa también disminuyó, ya que se requirieron 15 h de incubación para que se metabolizase el 49 % de la glucosa (39g) y 20 h para que se fermentase el 84% (67 g). Durante las últimas 4 h de incubación sólo se fermentaron 3 g de glucosa, lo que significa que finalizada la incubación se había metabolizado el 88% de la glucosa (70 g).

Finalmente, *E. faecium* T136 se desarrolló, aunque lenta y débilmente, cuando el pH del medio de cultivo se mantuvo a 5,2; sin embargo, no se detectó actividad antimicrobiana debida a la enterocina B o a la enterocina A en el sobrenadante del cultivo (Figura 4.20C).

Los resultados anteriores demuestran que la máxima actividad antimicrobiana de la enterocina B (3.858 UB/ml) y de la enterocina A (1.114 UB/ml) se obtiene cuando *E. faecium* T136 se desarrolla anaeróbicamente en un fermentador a 30°C y pH constante de 5,7 durante 20 y 18 h, respectivamente. Con el objeto de cuantificar la optimización de la producción de cada una de las bacteriocinas se determinó, mediante un ensayo en placas microtituladoras, la actividad antimicrobiana del sobrenadante de un cultivo de *E. faecium* T136 desarrollado aeróbicamente a 30°C durante 16 horas sin controlar el pH del cultivo, empleando como microorganismos indicadores *Lb. sake* 148 y *P. pentosaceus* FBB61. La actividad antimicrobiana del sobrenadante debida a la enterocina B fue de 219 UB/ml, mientras que en el caso de la enterocina A se detectaron 62 UB/ml. De estos resultados se deduce que el desarrollo de *E. faecium* T136 anaeróbicamente en un fermentador a 30°C manteniendo el pH constante a

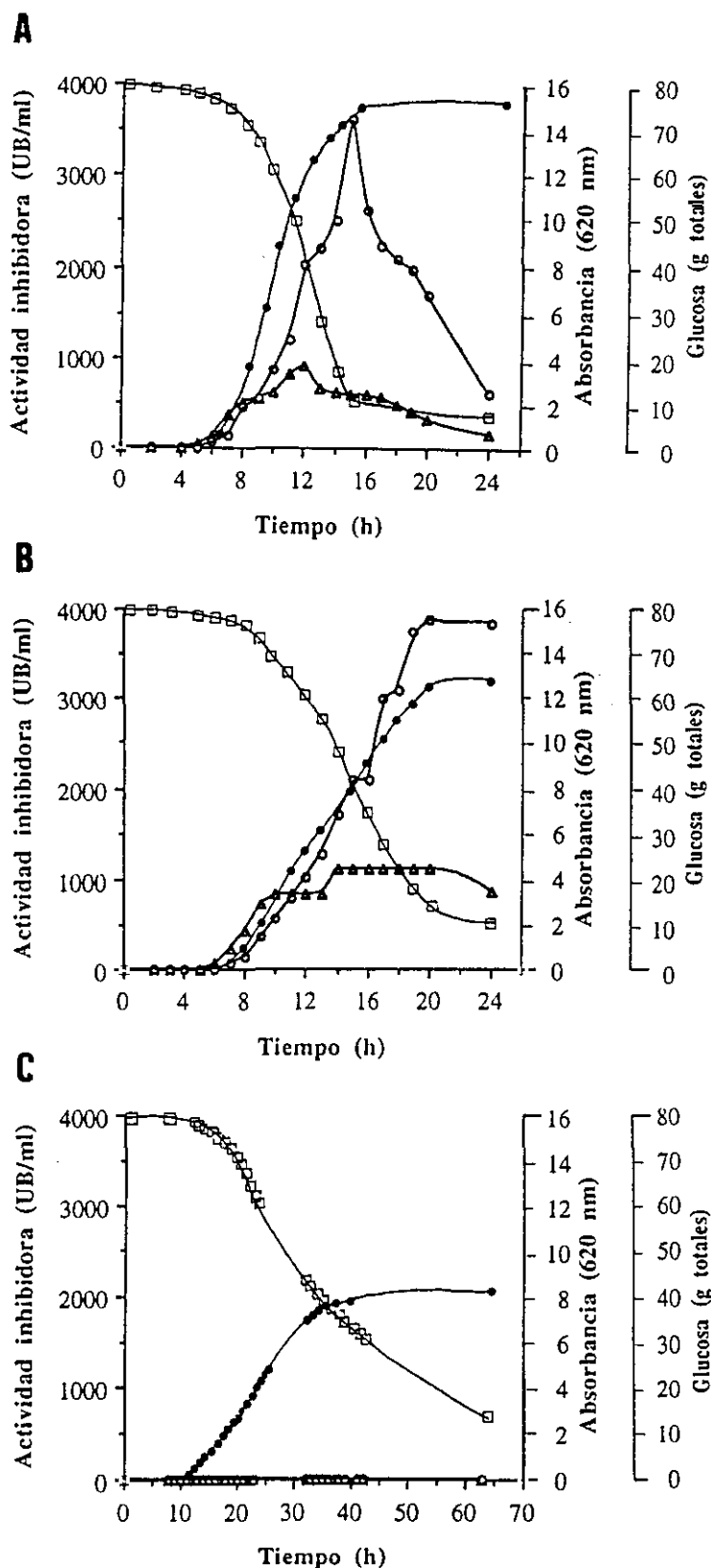


Figura 4.20. Cinéticas del crecimiento (●-●-●) y de la producción de enterocina B (○-○-○) y de enterocina A (△-△-△) de *E. faecium* T136 desarrollado a 30°C durante 24 h en un fermentador manteniendo el pH constante a 6,2 (A) y 5,7 (B) y durante 63 h manteniendo el pH constante a 5,2 (C); (□-□-□) consumo de glucosa durante la fermentación.

5,7 permite incrementar aproximadamente 18 veces la producción de enterocina B y de enterocina A.

IV.11.2.2. Purificación a homogeneidad de la enterocina B y de la enterocina A

Una vez optimizada la producción de las enterocinas B y A se llevó a cabo su purificación a homogeneidad, mediante el protocolo descrito en la sección III.2.10.4.2, a partir del sobrenadante obtenido por centrifugación de 2 l de cultivo de *E. faecium* T136 (inóculo inicial del 0,1%) desarrollado anaeróbicamente en MRS a 30°C en el fermentador a pH constante de 5,7 durante 18 horas. La actividad antimicrobiana de las distintas fracciones obtenidas durante la purificación se evaluó frente a *P. pentosaceus* FBB61 y *Lb. sake* 148, empleando un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.3.4). De este modo, se realizó un seguimiento del proceso de purificación de cada una de las bacteriocinas de forma independiente, como se muestra en la Tabla IV.18. La actividad antimicrobiana total del sobrenadante libre de células (fracción I) debida a la enterocina B y a la enterocina A fue de 4.599.606 y 1.500.000 UB, respectivamente. Tras la purificación de esta fracción por cromatografía de interacción hidrofóbica (Amberlite XAD-16) se eluyó la fracción II de 250 ml que mostró un 95% (4.374.419 UB) de la actividad antimicrobiana inicial de la bacteriocina B y un 41% (616.000 UB) de la correspondiente a la enterocina A. Esta fracción se aplicó a una columna de intercambio catiónico (SP-Sepharose), eluyéndose después la fracción III de 50 ml cuya actividad antimicrobiana debida a las enterocinas B y A fue de 3.662.719 UB y 300.000, respectivamente. A continuación, esta fracción se aplicó a una columna de interacción hidrofóbica (Octyl-Sepharose CL4B), lo que permitió concentrar ambas bacteriocinas en una única fracción de 10 ml (fracción IV) que mostró el 44% (2.048.000 UB) de la actividad inicial de la enterocina B del sobrenadante y el 5,3% (80.110 UB) en el caso de la enterocina A. Posteriormente, la fracción IV se aplicó a una columna de fase reversa (PepRPC HR5/5) integrada en un equipo de FPLC y se realizó la elución gradual de las diversas sustancias proteicas contenidas en la misma. Cuando la concentración de 2-propanol alcanzó un 24% eluyeron unas fracciones que contenían enterocina A, mientras que las fracciones con enterocina B no eluyeron hasta que se alcanzó un 28% de 2-propanol (no se muestran los resultados). Las fracciones que contenían enterocina B se mezclaron, al igual que las que las que contenían enterocina A, y se recromatografiaron bajo condiciones similares pero empleando un gradiente de elución isocrático del 28%, en el caso de la enterocina B, y del 24% para la enterocina A (Figuras 4.21 y 4.22).

En el cromatograma de la Figura 4.21 se observa que al principio de la elución se detectaron dos picos de A_{280} que no mostraron actividad antimicrobiana frente a *Lb. sake* 148. A continuación eluyó un pico de absorbancia (fracción 6) que coincidió con el pico de actividad antimicrobiana debida a la enterocina B. A juzgar por el cromatograma obtenido, la enterocina B había sido purificada a homogeneidad y mostró una actividad antimicrobiana total de 753.339 UB, por lo que el rendimiento de su purificación fue del 16% (fracción VB; Tabla IV.18).

En lo que respecta al cromatograma de la enterocina A, en la Figura 4.22 se observa que durante la elución apareció un único pico de absorbancia (fracción 3) que coincidió con el de la actividad antimicrobiana frente a *P. pentosaceus* FBB61. Esta fracción, que contenía la

Tabla IV.18. Purificación de las enterocinas B y A producidas por *E. faecium* T136

| | Enterocina B | | | Enterocina A | | |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------|
| | Volumen (ml) | Actividad total (UB) ^a | Recuperación (%) | Volumen (ml) | Actividad total (UB) ^a | Recuperación (%) |
| Sobrenadante (Fracción I) | 2.000 | 4.599.606 | 100 | 2.000 | 1.500.000 | 100 |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción II) | 250 | 4.374.419 | 95 | 250 | 616.000 | 41 |
| Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción III) | 50 | 3.662.719 | 79 | 50 | 300.000 | 20 |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción IV) | 10 | 2.048.000 | 44 | 10 | 80.110 | 5,3 |
| Cromatografía de fase reversa (Fracciones VB y VA*) | 1,1 | 753.339 | 16 | 0,9 | 74.071 | 5 |

^aActividad antimicrobiana total (UB), recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el desarrollo de *Lb. sake* 148, en el caso de la enterocina B, y de *P. acidilactici* FBB61, en el caso de la enterocina A, multiplicado por el volumen en mililitros. *Las fracciones VB y VA corresponden, respectivamente, a la enterocina B y a la enterocina A purificadas a homogeneidad.

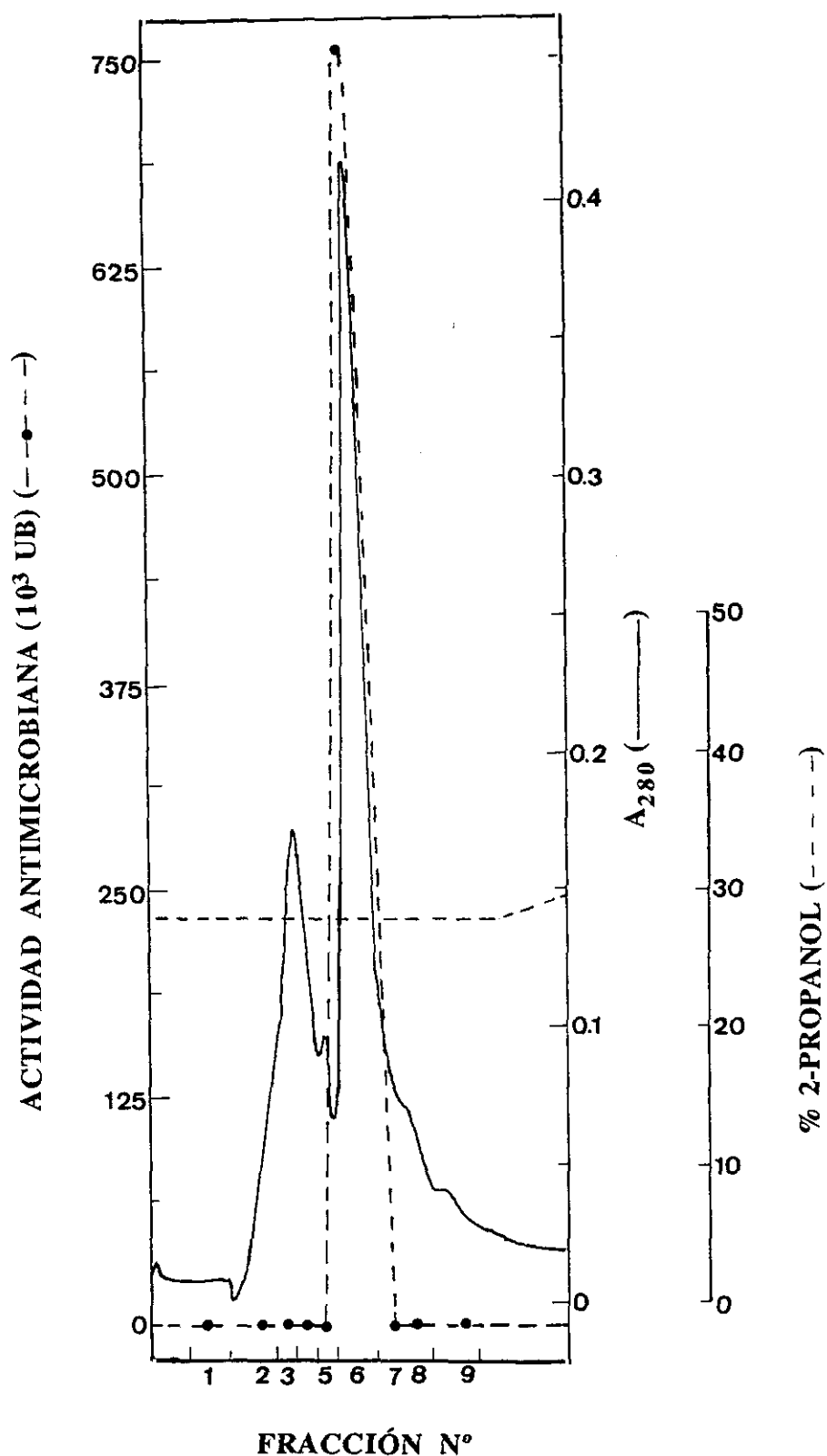


Figura 4.21. Purificación de la enterocina B de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (fracción IV; Tabla IV.18)

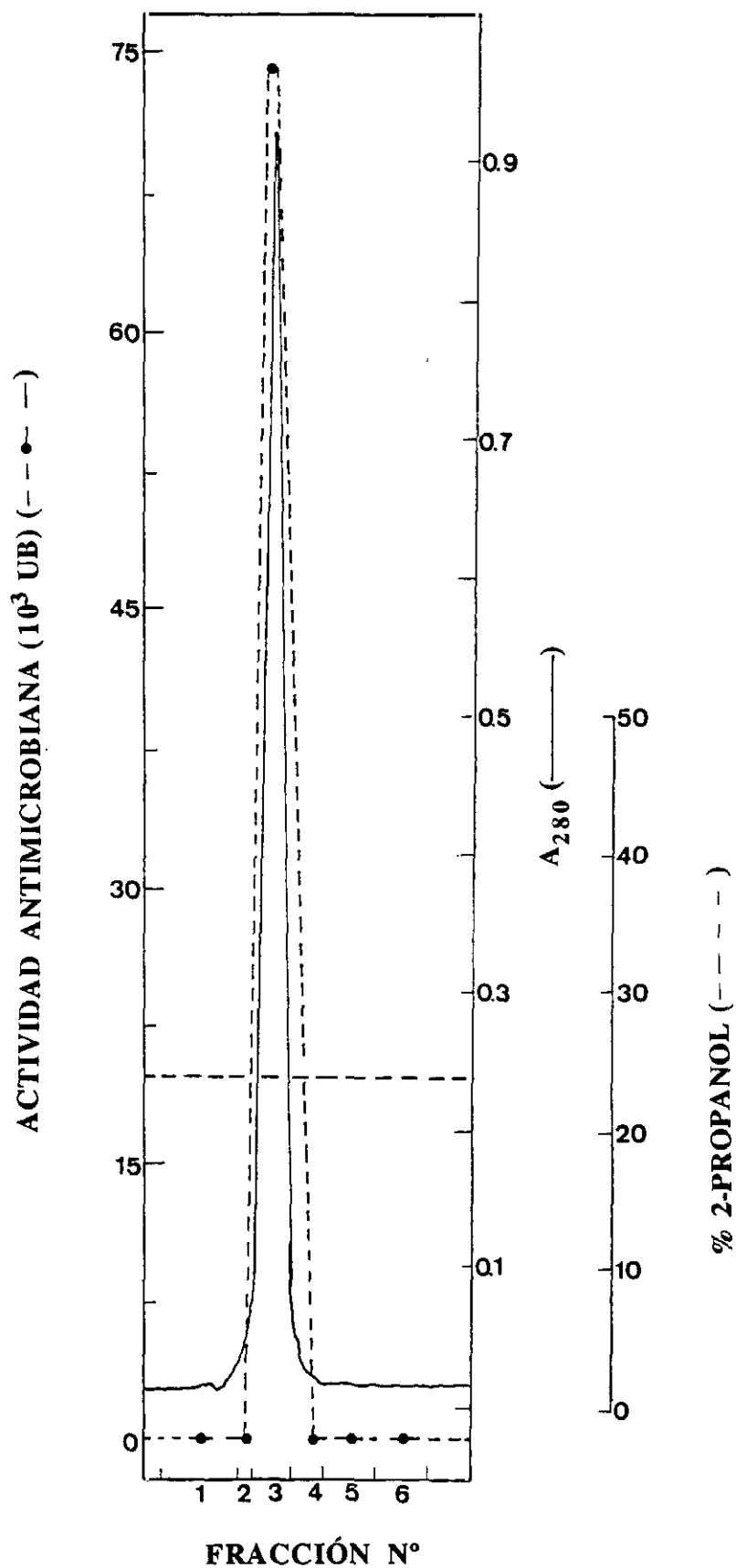


Figura 4.22. Purificación de la enterocina A de *E. faecium* T136 por cromatografía de fase reversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (fracción IV; Tabla IV.18)

enterocina A purificada a homogeneidad, mostró una actividad antimicrobiana total de 74.071 UB, lo que representa una recuperación del 5% de la actividad antimicrobiana inicial (fracción VA; Tabla IV.18).

A partir de este momento, el trabajo se centró fundamentalmente en la caracterización bioquímica y genética de la enterocina B de *E. faecium* T136; no obstante, también se determinó el efecto del ditiotritol en la actividad antimicrobiana de la enterocina A de *E. faecium* T136, su CIM frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria y, asimismo, la secuencia nucleotídica del gen estructural que codifica la producción de enterocina A en *E. faecium* T136.

IV.11.3. Composición aminoacídica de la enterocina B

En la Tabla IV.19 se muestra la composición aminoacídica obtenida por hidrólisis ácida de la enterocina B de *E. faecium* T136 purificada a homogeneidad (fracción VB; Tabla IV.18), de la que se deduce lo siguiente:

1) La bacteriocina posee 52-54 residuos aminoacídicos, de los cuales 8 residuos, es decir el 15%, son glicina; 23 residuos, es decir el 44 % de la molécula, corresponden a aminoácidos apolares y 21-23 residuos corresponden a aminoácidos polares (40-42%).

2) En cuanto a los residuos apolares, se detecta la presencia de los aminoácidos alifáticos alanina (8), isoleucina (2), leucina (5), prolina (4), y valina (1); asimismo, es posible que la molécula contenga el aminoácido sulfurado metionina (1) y los aminoácidos aromáticos fenilalanina (1) y tirosina (1).

3) Con respecto a los aminoácidos polares, se encuentran 6 residuos con carga neta positiva a pH 6,0-7,0, entre los que se incluyen la arginina (2 residuos), la histidina (1) y la lisina (3) y, al menos, 4-5 residuos sin carga neta a pH 6,0-7,0 (2-3 residuos de cisteína y 2 residuos de serina). Los restantes 11-12 residuos corresponden a aminoácidos con carga neta negativa o sin carga neta (9 residuos de Asx [Asp/Asn] y 2-3 residuos de Glx [Glu/Gln]).

IV.11.4. Secuencia aminoacídica de la enterocina B

En la Figura 4.23 se muestra la secuencia aminoacídica de los 41 aminoácidos del extremo N-terminal de la enterocina B, obtenida mediante degradación directa de Edman. Los 19 primeros residuos aminoacídicos concuerdan con los de la secuencia aminoacídica parcial obtenida a partir de la fracción A3 (Tabla IV.17; sección IV.11.1) y permitieron, además, identificar los residuos de las posiciones 1, 3 y 5 como ácido glutámico (Glu1), ácido aspártico (Asp3) y arginina (Arg5). El aminoácido correspondiente a la posición 22 no pudo determinarse con certeza, aunque posiblemente se trata de un residuo de alanina (Ala 22). Por otra parte, aunque sólo se obtuvo la secuencia de los primeros 41 aminoácidos es posible que, de acuerdo con los resultados de la composición aminoacídica obtenida por hidrólisis ácida de la bacteriocina (Tabla IV.19; sección IV.11.3), la molécula contenga otros 11-13 residuos aminoacídicos en su extremo C-terminal. La molécula peptídica no presenta la secuencia consenso característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina.

Tabla IV.19. Composición aminoacídica de la enterocina B de *E. faecium* T136

| Aminoácido | Contenido (pmol) | <u>Número de residuos</u> | | |
|------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | Por hidrólisis ^a | Por secuencia ^b | Por genética ^c |
| Asx | 8.866,0 | 9 | 6 | 8 |
| Ala | 7.765,9 | 8 | 6 | 8 |
| Arg | 2.062,6 | 2 | 2 | 2 |
| Cys | 2.648,9 | 2-3 | - | 2 |
| Gly | 7.815,0 | 8 | 7 | 8 |
| Glx | 2.499,6 | 2-3 | 2 | 2 |
| His | 1.041,0 | 1 | 1 | 1 |
| Ile | 2.120,8 | 2 | 2 | 2 |
| Leu | 4.854,4 | 5 | 4 | 5 |
| Lys | 2.812,5 | 3 | 3 | 4 |
| Met | 1.078,8 | 1 | 1 | 1 |
| Phe | 1.154,3 | 1 | 1 | 1 |
| Pro | 4.236,5 | 4 | 3 | 4 |
| Ser | 2.221,7 | 2 | 1 | 2 |
| Thr | - | - | - | 0 |
| Trp | ND | ND | 1 | 1 |
| Tyr | 959,0 | 1 | - | 1 |
| Val | 1.030,1 | 1 | - | 1 |
| Xaa | ND | ND | 1 | 0 |
| Total | | 52-54 | 41 | 53 |

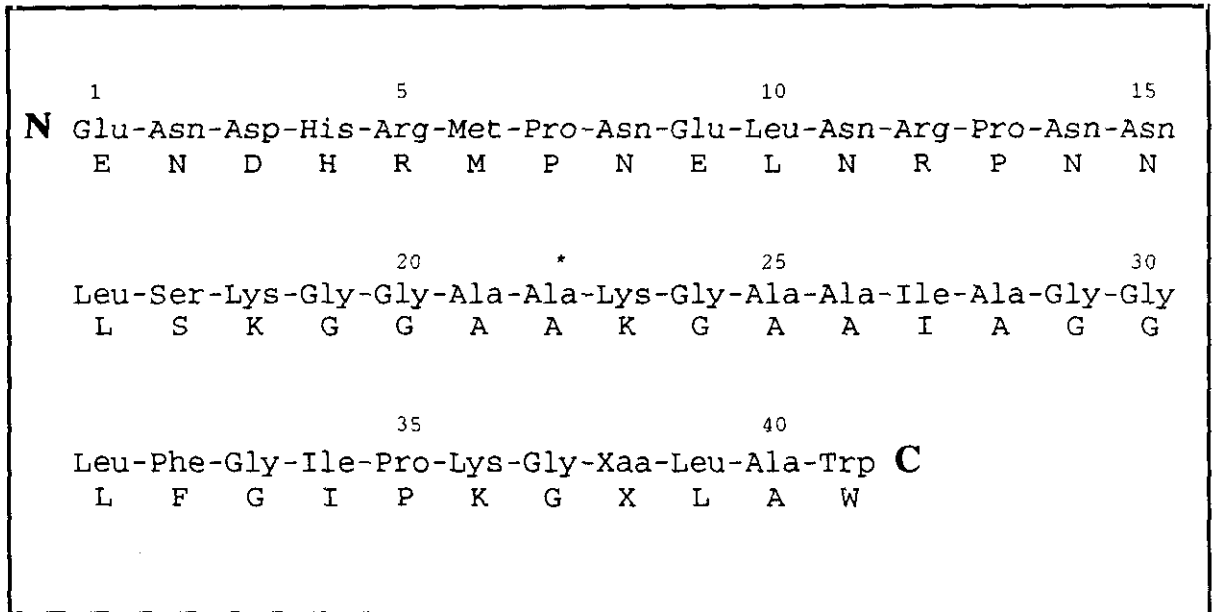
^aNúmero más probable de residuos aminoacídicos por molécula asumiendo que la enterocina B contiene 1 residuo de tirosina.

^bNúmero de residuos aminoacídicos de la enterocina B a partir de la secuencia proteica obtenida mediante degradación de Edman.

^cNúmero de residuos aminoacídicos de la enterocina B a partir de la secuencia proteica obtenida mediante la secuenciación de su correspondiente gen estructural.

Código trislabo de los aminoácidos y símbolos como en la Tabla IV.13.

Figura 4.23. Secuencia aminoacídica de la enterocina B de *E. faecium* T136 obtenida por degradación de Edman.



Código trisílabo de los aminoácidos como en la Tabla IV.13. Código monosílabo de los aminoácidos y símbolos como en la Figura 4.8.

IV.11.5. Tamaño molecular de la enterocina B por espectrometría de masas

La enterocina B producida por *E. faecium* T136 se analizó por espectrometría de masas, con el objeto de determinar su tamaño molecular. El espectro de masas obtenido (Figura 4.24) muestra los picos correspondientes a las distintas formas ionizadas de la molécula, así como su masa molecular aparente. Como se observa, aparecen 4 picos con máxima intensidad, correspondientes a las formas ionizadas (positivas) mayoritarias de la bacteriocina. A partir de la masa molecular aparente de cada uno de estos componentes mayoritarios (918,4, 1.096,4, 1.370,2 y 1.828,0 Da, respectivamente), de su intensidad relativa y de su carga eléctrica (+6, +5, +4 y +3, respectivamente) se calculó, mediante un análisis matemático, el tamaño molecular real de cada uno de ellos, que fue de 5.510,4; 5.482,0; 5.480,8 y 5.484,9, respectivamente. El valor promedio de los resultados generados permitió determinar el tamaño molecular de la enterocina B como de $5.479,0 \pm 1,2$ Da.

IV.11.6. Efecto del ditiotritol (DTT) en la actividad antimicrobiana de la enterocina B y de la enterocina A

Las muestras de enterocina B y enterocina A purificadas a homogeneidad se trataron con el agente reductor DTT, a una concentración de 10mM, durante 12-14 h a 30°C (sección III.2.10.7). Una vez excluido el efecto inhibitor del DTT en el desarrollo del microorganismo indicador (*E. faecium* P13) se determinó el porcentaje de reducción de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas tratadas con este agente reductor. La actividad antimicrobiana residual de las enterocinas B y A fue de 1.132 y 1.420 UB/ml, respectivamente, frente a las 10.752 y 204.000 UB/ml cuantificadas en los correspondientes controles, lo que supone una reducción en su actividad biológica del 90 y 99,3 %, respectivamente.

IV.11.7. Concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina B y de la enterocina A frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria

La concentración inhibidora mínima (CIM) de la enterocina B y de la enterocina A de *E. faecium* T136 se determinó, mediante un ensayo en placas microtituladoras, frente a un gran número de bacterias lácticas y microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, según el procedimiento descrito en la sección III.2.10.8. En la Tabla IV.20 se muestran las concentraciones de enterocina B y de enterocina A que fueron necesarias para inhibir en un 50% el desarrollo de cada microorganismo indicador. De los 7 lactobacilos analizados, solamente *Lb. fermentum* CECT9338 resultó inhibido por ambas bacteriocinas, si bien la CIM de la enterocina A fue de 810 ng/ml, es decir aproximadamente 24 veces mayor que la CIM de la enterocina B, y *Lb sake* 148 fue únicamente sensible a la enterocina B, con una CIM de 210 ng/ml. Asimismo, *Lb. curvatus* NCFB2739 fue solamente sensible a la enterocina A, con una CIM de 480 ng/ml. Con respecto a los 3 pediococos empleados como indicadores, *P. pentosaceus* FBB61 y *P. pentosaceus* FBB63 resultaron inhibidos únicamente por la enterocina A, con CIMs de 373 y 610 ng/ml, respectivamente, y *P. pentosaceus* PC1 no resultó inhibido por ninguna de ellas. Por el contrario, las dos especies del género *Enterococcus*

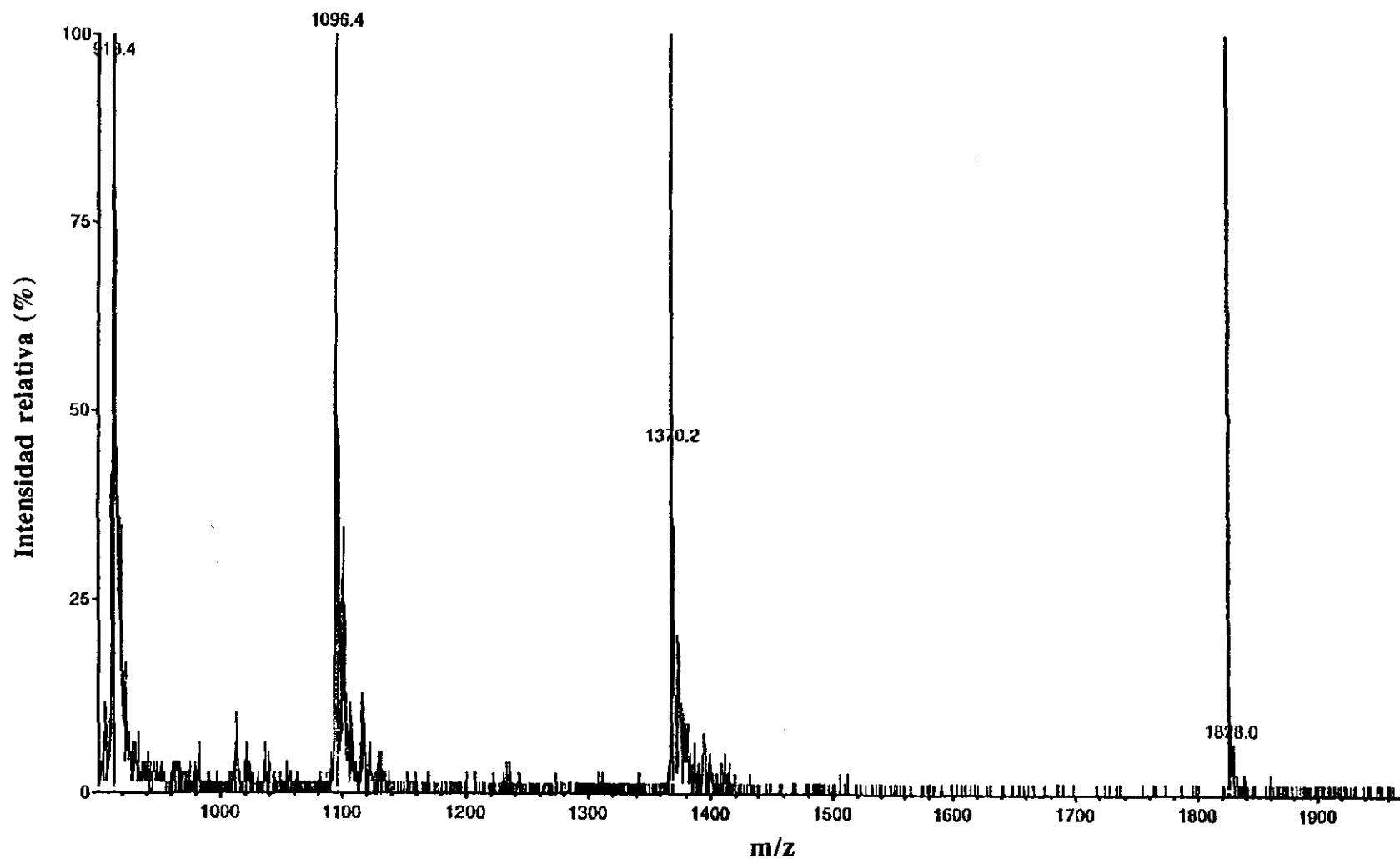


Figura 4.24. Espectro de masas de la enterocina B de *E. faecium* T136. Las cifras que se muestran sobre los picos corresponden a la masa molecular aparente de las formas ionizadas mayoritarias de la bacteriocina.

Tabla IV.20. Concentración inhibidora mínima (CIM) de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136^a

| Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | CIM (ng/ml) | | Microorganismo indicador | Cepa | Origen ^b | CIM (ng/ml) | |
|---------------------------------|---------|---------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------|---------------------|-------------|-------|
| | | | B | A | | | | B | A |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 334 | ATCC | - | - | <i>Clostridium sporogenes</i> | C22/10 | TNO | 460 | 1.000 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 2739 | NCFB | - | 480 | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 3,5CT | TNO | 550 | 1.400 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 15009 | ATCC | - | - | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 1754 | NCDO | 140 | 380 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9338 | CECT | 34 | 810 | <i>Propionibacterium</i> sp. | P4 | TNO | 90 | 50 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1193 | NCDO | - | - | <i>Propionibacterium</i> sp. | P6 | TNO | 50 | 40 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 2714 | NCFB | - | - | <i>Prop. acidipropionici</i> | 563 | NCDO | 90 | 40 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | 148 | FVM | 210 | - | <i>Staphylococcus carnosus</i> | MC1 | TNO | 410 | 180 |
| | | | | | <i>Listeria innocua</i> | BL/8626 | TNO | 430 | 120 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB61 | TNO | - | 373 | <i>Bacillus cereus</i> | 9139 | ATCC | - | 682 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | FBB63 | TNO | - | 610 | <i>Clostridium perfringens</i> | 376 | CECT | - | - |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | PC1 | TNO | - | - | <i>Clostridium botulinum</i> | 551 | CECT | - | - |
| <i>Leuconostoc cremoris</i> | DB1275 | TNO | - | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | 7973 | NCTC | 150 | 40 |
| | | | | | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI5sv1/2 | FVM | 440 | 100 |
| <i>Lactococcus cremoris</i> | CNRZ117 | INRA | - | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5105 | NCTC | 200 | 50 |
| | | | | | <i>Listeria monocytogenes</i> | LI1sv4 | FVM | 160 | 40 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | P13 | FVM | 234 | 26 | <i>Listeria monocytogenes</i> | ScottA | FVM | 140 | 40 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | EF | TNO | 28 | 11 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 137 | FRI | 460 | 530 |
| | | | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | 196E | FRI | 1.000 | 580 |
| <i>Micrococcus varians</i> | 230 | CECT | - | - | <i>Staphylococcus aureus</i> | 472 | FRI | 1.300 | 770 |

^aLa CIM de las enterocinas B y A purificadas se determinó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.10.8). ^bAbreviaturas como en la Tabla III.1. Símbolos: -, inhibición no detectada empleando 5,0 µg/ml de enterocina B y 3,75 µg/ml de enterocina A; ND, no determinado.

analizadas se vieron afectadas por ambas bacteriocinas, si bien en los dos casos, las CIMs de la enterocina A fueron menores que las CIMs de la enterocina B. El desarrollo de *L. cremoris* CNRZ117, *Lc. cremoris* DB1275 y *M. varians* 230 no resultó inhibido por ninguna de las dos bacteriocinas, empleando concentraciones máximas de 5,0 µg/ml de enterocina B y de 3,75 µg/ml de enterocina A.

En cuanto a los microorganismos alterantes empleados como indicadores, todos ellos resultaron inhibidos por la enterocina B y por la enterocina A purificadas a homogeneidad. Las CIMs frente a las 3 cepas analizadas del género *Propionibacterium* fluctuaron entre 40-50 ng/ml de enterocina A y 50-90 ng/ml de enterocina B. Asimismo, para inhibir en un 50% el desarrollo de *Ls. innocua* BL/8626 y *St. carnosus* MC1 fueron suficientes 120 y 180 ng/ml de enterocina A, mientras que se requirieron 430 y 410 ng/ml de enterocina B, respectivamente. Las CIMs de enterocina A frente a las 3 cepas analizadas del género *Clostridium* fueron aproximadamente 2-3 veces superiores a las obtenidas para la enterocina B, que fueron de 140-550 ng/ml.

Por otra parte, las enterocinas B y A fueron muy efectivas frente a la mayoría de los microorganismos patógenos analizados, siendo destacables las CIMs de enterocina A (40-100 ng/ml) y de enterocina B (140-440 ng/ml) requeridas para inhibir el desarrollo de las 5 cepas analizadas de *Listeria monocytogenes*. Por el contrario, *Cl. perfringens* CECT376 y *Cl. botulinum* CECT551 no resultaron inhibidos por ninguna de las dos bacteriocinas. Asimismo, la enterocina B no fue activa frente a *B. cereus* ATCC9139 y se requirieron 682 ng/ml de enterocina A para inhibir en un 50% su crecimiento. Las 3 cepas analizadas de *St. aureus* fueron inhibidas por concentraciones de enterocina A entre 530 y 770 ng/ml. Las CIMs de la enterocina B frente a *St. aureus* FRI137 fueron similares (460 ng/ml), pero, sin embargo, se requirieron 1.000 y 1.300 ng/ml de bacteriocina para inhibir el desarrollo de *St. aureus* FRI196E y *St. aureus* FRI472, respectivamente.

De estos resultados se deduce que la enterocina B y la enterocina A purificadas a homogeneidad poseen actividad antimicrobiana independiente y muestran un amplio espectro de acción, en el que se incluyen un gran número de microorganismos alterantes y patógenos. La mayoría de las bacterias lácticas analizadas fueron resistentes a ambas bacteriocinas, sin embargo, pequeñas concentraciones de enterocina B -entre 50 y 550 ng/ml- y de enterocina A -entre 40 y 580 ng/ml- fueron suficientes para inhibir en un 50% el crecimiento de la mayoría de los microorganismos alterantes y patógenos de importancia higiénico-sanitaria como, entre otros, *Cl. tyrobutyricum*, *Propionibacterium* spp., *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*.

IV.12. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENTEROCINA B DE *E. faecium* T136

IV.12.1. Aislamiento y visualización del ADN total de *E. faecium* T136

El ADN cromosómico y plasmídico de *E. faecium* T136 se aisló a partir de 10 ml de un cultivo en caldo MRS según el método de lisis alcalina descrito por Anderson y McKay (1983), con las modificaciones indicadas en la sección III.2.11.2. Los resultados obtenidos tras realizar la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) se muestran en la Figura 4.9 (sección IV.10.2). El ADN cromosómico de *E. faecium* T136 se visualizó en la porción superior del gel como una única mancha nucleotídica, encima de la cual se detectó, al igual que en el caso de *E.*

faecium P13, un plásmido de elevado tamaño molecular, posiblemente mayor de 60 Kb.

IV.12.2. Secuenciación del gen estructural de la enterocina B y de las regiones adyacentes

La secuencia nucleotídica del fragmento de 352 pb del ADN de *E. faecium* T136 que contiene el gen estructural de la enterocina B (*entB*) se determinó secuenciando diversos fragmentos de PCR mediante el método enzimático de Sanger o método didesoxi de finalización de cadena, como se describió en la sección III.2.11.10. La secuencia y la dirección de los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en los experimentos de PCR o de secuenciación, su temperatura de fusión y su localización con respecto a la secuencia aminoacídica de la enterocina B se muestran en la Tabla IV.21.

IV.12.2.1. Obtención de la primera secuencia nucleotídica

A partir de la secuencia aminoacídica de la enterocina B, obtenida mediante degradación de Edman (Figura 4.23), se diseñaron los oligonucleótidos degenerados ENTB1 y ENTB2, seleccionando para ello zonas de la secuencia que indujeran la mínima degeneración del código genético. Los fragmentos seleccionados fueron los correspondientes a los aminoácidos entre las posiciones 2 y 7, en el caso del oligonucleótido ENTB1, y entre las posiciones 27 y 32, para el cebador ENTB2 (Figura 4.25). A partir de la secuencia aminoacídica de ambos fragmentos se dedujo la secuencia del ARN mensajero correspondiente y la del ADN que en él se transcribe. La secuencia de ADN del fragmento correspondiente a los aminoácidos entre las posiciones 2 y 7 mostraba cuatro posiciones de doble ambigüedad y una de cuádruple, por lo que el número de secuencias posibles era de 64. A partir de esta información se sintetizó el cebador degenerado ENTB1. La secuencia de ADN del fragmento correspondiente a los aminoácidos entre las posiciones 27 y 32 mostraba una posición de doble ambigüedad, una de triple y cuatro de cuádruple, por lo que el número de secuencias posibles era de 1.536. En base a la información conocida sobre los codones más frecuentes del género *Enterococcus*, se escogió el triplete TAG para el aminoácido isoleucina, con lo que se eliminó la degeneración triple originada por la tercera posición de este codon (TAT/G/A) y de este modo se redujo el número de secuencias posibles a 512 y se sintetizó el cebador degenerado ENTB2. A continuación, se realizó un PCR específico (sección III.2.11.6.3) empleando una muestra de ADN total de *E. faecium* T136 y los cebadores ENTB1 y ENTB2. La etapa de hibridación se realizó a 50°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron tras realizar la electroforesis de la totalidad del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% (p/v). El cálculo teórico del tamaño del fragmento que se amplificaría teniendo en cuenta la posición de los cebadores con respecto a la secuencia peptídica permitió identificar una banda de 90 pb como la correspondiente al fragmento positivo. El fragmento se extrajo del gel de agarosa y, a continuación, se purificó para eliminar productos que pudieran interferir en las posteriores reacciones de secuenciación (secciones III.2.11.8 y III.2.11.7). Antes de proceder a la secuenciación del fragmento purificado, éste se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I para convertir sus extremos cohesivos en planos y, de este modo, posibilitar su inserción en el fagémido pBluescript II SK+, previamente tratado con el enzima de restricción

Tabla IV.21. Oligonucleótidos sintéticos empleados en las experiencias de PCR y de secuenciación de los genes estructurales de la enterocina B y de la enterocina A

| Nombre | Empleo | Secuencia nucleotídica (5' - 3') | Tm (°C) ^a | Loc ^b | Dir ^c |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------|------------------|
| ENTB1 (d) | PCR _{E,H} SEQ | AAY GAY CAY MGN ATG CC | 51,0 | 2-7 | 5' - 3' |
| ENTB2 (d) | PCR _E | AAN ARN CCN CCN GCG AT | 53,0 | 27-32 | 3' - 5' |
| ENTB3 | PCR _{E,H} SEQ | AGA CCT AAC AAC TTA TCT AAA G | 50,7 | 12-19 | 5' - 3' |
| ENTB4 | PCR _H | GCG ATT GCA GCA CCA CAT TTT G | 58,1 | 21-28 | 3' - 5' |
| ENTB5 | PCR _{E,H} SEQ | GTT GCA TTT AGA GTA TAC ATT TGC | 53,6 | 46-53 | 3' - 5' |
| ENTA1 (TH10) | PCR _{E,H} SEQ | GAT TAT GAA ACA TTT AAA AAT TTT GTC | 55,0 | Líder | 5' - 3' |
| ENTA2 | PCR _E | AAA ACC ACC TAT AGA CAT TCC TGC | 57,0 | 31-38 | 3' - 5' |
| SK2 (bio) | PCR _H SEQ | CCG CTC TAG AAC TAG TGG ATC | 54,2 | - | 5' - 3' |

^aTm (°C), temperatura de fusión del ADN.

^bLoc, localización de los oligonucleótidos en la secuencia aminoacídica de la enterocina B o de la enterocina A; el cebador TH10 (A1) se localiza entre los aminoácidos correspondientes a las posiciones -11 y -18 de la secuencia líder de la enterocina A.

^cDir, se refiere a la dirección de los oligonucleótidos con respecto a la hebra codificante; es decir, hacia su extremo 3' ó *downstream* (5' - 3') o hacia su extremo 5' ó *upstream* (3' - 5').

Los paréntesis indican: (d), oligonucleótido degenerado; (bio), oligonucleótido biotinizado. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; la modalidad de PCR se indica con los subíndices: E, específico; H, hemiespecífico. SEQ, reacciones de secuenciación.

Los desoxirribonucleótidos con las diferentes bases nitrogenadas del ADN se indican como: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina; Y (C/T); R (A/G); M (C/A); N (A/C/G/T).

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por la autora, a excepción de ENTA1 (TH10) (Aymerich *et al.*, 1996) y SK2, cuya secuencia es específica del vector comercial pBluescript II SK+.

Figura 4.25. Diseño de los cebadores degenerados ENTB1 y ENTB2 a partir de la secuencia aminoacídica de la enterocina B obtenida por degradación de Edman

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|--|--|---|--------------|------------------------------|--|--|--|------------------------------|--|--|--|--|----|----------|
| | 1 | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | 20 | |
| N | Glu-Asn-Asp-His-Arg-Met-Pro-Asn-Glu-Leu-Asn-Arg-Pro-Asn-Asn-Leu-Ser-Lys-Gly-Gly- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | E N D H R M P N E L N R P N N L S K G G | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | * | | 25 | | | | | 30 | | | | | 35 | | | | | 40 | |
| | Ala-Ala-Lys-Gly-Ala-Ala-Ile-Ala-Gly-Gly-Leu-Phe-Gly-Ile-Pro-Lys-Gly-Xaa-Leu-Ala-Trp | | | | | | | | | | | | | | | | | | C |
| | A A K G A A I A G G L F G I P K G X L A W | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 2 | | | | | 7 | | | | | 27 | | | | | 32 | |
| Fragmentos seleccionados | | | -Asn-Asp-His-Arg-Met-Pro- | | | | | | | | | | -Ile-Ala-Gly-Gly-Leu-Phe- | | | | | | |
| ARNm | | | 5' AAC GAC CAC CGA AUG CC 3' | | | | | | | | | | 5' AUA GCA GGA GGA CUA UU 3' | | | | | | |
| | | | U U U A C | | | | | | | | | | C C C C U C | | | | | | |
| | | | | | | | G | | | | | | U G G G G | | | | | | |
| | | | | | | | U | | | | | | U U U U | | | | | | |
| ADNc | | | 3' TTG CTG GTG GCT TAC GG 5' | | | | | | | | | | 3' TAT CGT CCT CCT GAT AA 5' | | | | | | |
| | | | A A A T G | | | | | | | | | | G G G G A G | | | | | | |
| | | | | | | | C | | | | | | A C C C C | | | | | | |
| | | | | | | | A | | | | | | A A A A | | | | | | |
| Cebadores | ENTB1 | 5' AAY GAY CAY MGN ATG CC 3' | | | | | | ENTB2 | 5' AA NAR NCC NCC NGC GAT 3' | | | | | | | | | | |

Código trisílabo de los aminoácidos como en la Tabla IV.13; código monosílabo de los aminoácidos y símbolos como en la Figura 4.8. Los desoxirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.21.

HincII (secciones III.2.11.9 y III.2.11.4.2). A continuación, empleando como molde de ADN esta ligación y como cebadores el oligonucleótido degenerado ENTB1 y el oligonucleótido SK2 biotinizado en su extremo 5', se realizó un PCR hemiespecífico con una temperatura de hibridación de 51°C durante 30 seg y un tiempo de polimerización a 72°C de 10 seg. Teniendo en cuenta el tamaño del inserto ligado y la posición del cebador SK2 y de la diana de restricción de *HincII* en la secuencia nucleotídica del fagémido pBluescript II SK+, el fragmento positivo que se amplificaría tendría un tamaño de 154 pb, correspondiente a la suma de las 90 pb del inserto más las 21 pb del oligonucleótido SK2 y las 43 pb entre el final de la secuencia de SK2 y la diana de restricción para *HincII*. Tras realizar la electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% (p/v) se visualizó la presencia de una banda mayoritaria correspondiente al fragmento de 154 pb, que se extrajo del gel de agarosa y se purificó para proceder a su secuenciación. En primer lugar, se separaron las dos hebras de ADN del fragmento 154 pb-*HincII*, gracias a la especificidad del cebador SK2 marcado con biotina por la estreptavidina (sección III.2.11.10.2), y se secuenciaron las hebras positiva (biotinizada) y negativa, empleando como cebadores de secuenciación el oligonucleótido degenerado ENTB1 y SK2, respectivamente. Tras la autorradiografía correspondiente se pudieron leer con claridad un total de 57 pb (Figura 4.26A). A partir de esta secuencia nucleotídica se dedujeron las posibles secuencias aminoacídicas y, tras compararlas con la de la enterocina B, se confirmó que la hebra 5'-3' (hebra codificante) del fragmento secuenciado contenía la región del gen estructural de la enterocina B (*entB*) que codifica la región de la bacteriocina entre los aminoácidos 12 y 30 (Figura 4.26B), obteniéndose de este modo la primera pauta específica de su secuenciación.

IV.12.2.2. Secuenciación desde la mitad del gen estructural hacia su extremo 3'

A partir de la secuencia nucleotídica parcial del gen estructural de la enterocina B se diseñó el cebador específico ENTB3 y, a continuación, se realizaron cuatro PCRs hemiespecíficos empleando como ADN molde muestras que contenían fragmentos del ADN total de *E. faecium* T136 digerido con *DraI*, *HincII*, *RsaI* o *SspI* y ligados en el fagémido pBluescript II SK+ previamente tratado con *HincII* (mezclas de ligación *DraI*, *HincII*, *RsaI* y *SspI*) y, como cebadores, ENTB3 y SK2. La hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2,5 min. Tras realizar la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) se seleccionó un fragmento de 1,2 Kb, correspondiente a la ligación *HincII*, por ser el de mayor intensidad. Una vez extraído del gel y purificado se convirtió a cadena sencilla y se secuenció la hebra positiva, empleando ENTB3 como cebador de secuenciación. Tras la autorradiografía correspondiente se empezó a leer, con la carrera electroforética corta, a una distancia de 23 pb del cebador ENTB3, lo que permitió confirmar el final de la secuencia nucleotídica de 57 pb obtenida con el cebador ENTB1. Solapando las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas se obtuvo la secuencia de 130 pb desde la mitad del gen estructural de la enterocina B hacia su extremo 3'.

IV.12.2.3. Secuenciación desde el final del gen estructural hacia su extremo 5'

A partir de la secuencia nucleotídica de 130 pb obtenida con ENTB3 se diseñó el cebador específico ENTB5 y, a continuación, se realizaron siete PCRs hemiespecíficos empleando como

Figura 4.26. Secuencia nucleotídica de 57 pb del fragmento 154 pb-*HincII* de *E. faecium* T136 amplificado por PCR empleando los cebadores ENTB1 y SK2 (A) y secuencia aminoacídica de la región de la enterocina B codificada por la cadena en dirección 5'- 3'(B)^a

(A)

```

1                                     57
5' AGACCTAACAACTTATCTAAAGGTGGAGCAAAATGTGGTGCTGCAATTGCTGGGGGA 3'
3' TCAGGATTGTTCAATAGATTTCCACCAGCTTTTACACCACGACGTTAACGACCCCCT 5'

```

(B)

```

5' AGA CCT AAC AAC TTA TCT AAA GGT GGA GCA AAA TGT GGT GCT GCA ATT GCT GGG GGA 3'
  R  P  N  N  L  S  K  G  G  A  K  C  G  A  A  I  A  G  G

```

^aLa secuencia aminoacídica codificada por la cadena 5'- 3' corresponde a la región entre los aminoácidos 12 y 30 de la secuencia peptídica de la enterocina B obtenida por degradación de Edman. Los residuos aminoacídicos en cursiva, K y C, en las posiciones 22 y 23, respectivamente, no coinciden con los identificados por degradación de Edman (A22 y K23) (sección IV.11.4).

Los desoxirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.21. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

ADN molde las mezclas de ligación *DraI*, *RsaI*, *SspI*, *FspI*, *NaeI* y *StuI* y, como cebadores, ENTB5 y SK2. La hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2,5 min. En los productos de PCR de las ligaciones *FspI*, *NaeI* y *StuI*, no se visualizó ninguna banda. Empleando las ligaciones *DraI* y *RsaI* se obtuvieron varias bandas, correspondiendo las de mayor intensidad a un fragmento de 280 pb y a uno de 250 pb, respectivamente. Con la ligación *SspI* se consiguió amplificar, entre otros, un fragmento de 1,4 Kb, que se seleccionó por ser el fragmento mayoritario. Tras la extracción y purificación del fragmento 1,4 Kb-*SspI*, se llevó a cabo su conversión a cadena sencilla y, posteriormente, se secuenció la hebra positiva empleando ENTB5 como cebador de secuenciación. Con la carrera electroforética corta se empezó a leer a una distancia de 15 pb del cebador ENTB5, lo que permitió un solapamiento de 42 pb con la secuencia de 130 pb obtenida anteriormente. Solapando las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas se obtuvo una secuencia de 264 pb que permitió completar la secuencia del gen estructural de la enterocina B y avanzar hacia el extremo 5'.

La integración de los resultados anteriores permitió obtener la secuencia de 352 nucleótidos contiguos del ADN de *E. faecium* T136 que se muestra en la Figura 4.27.

IV.12.3. Análisis del gen estructural de la enterocina B y de las regiones adyacentes. Identificación de las regiones nucleotídicas relacionadas con la transcripción y con el inicio de la traducción.

El análisis informático de la secuencia nucleotídica de 352 pb del ADN de *E. faecium* T136 obtenida mediante la secuenciación de varios productos de PCR reveló que contiene un marco de lectura abierto (ORF), denominado *entB* (Figura 4.27), que corresponde al gen estructural de la enterocina B y que codifica un péptido de 71 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de 7.482 Da. Mediante la comparación de esta secuencia aminoacídica con la obtenida para la enterocina B por degradación de Edman, se deduce que esta bacteriocina se sintetiza como un precursor o prepéptido (preproenterocina B) que contiene una extensión N-terminal de 18 aminoácidos con un tamaño molecular teórico de 2.034 Da (Figura 4.28; Tabla IV.22). El punto de procesamiento del prepéptido se sitúa inmediatamente después de los dos residuos de glicina consecutivos (posiciones -2 y -1) de la extensión N-terminal, lo que da lugar a un péptido de 53 aminoácidos (enterocina B) con un tamaño molecular teórico de 5.465 Da (Tabla IV.22).

El análisis de la secuencia nucleotídica localizada delante del gen estructural de la enterocina B (*entB*) permitió identificar las secuencias hexaméricas correspondientes a las regiones -10 (TATAGA) y -35 (TTCAGA) del hipotético promotor de su transcripción, separadas por una distancia óptima de 16 pb (Figura 4.27). Asimismo, 4 pb debajo del codon de terminación de la traducción de la pre-enterocina B (UAA) se identificó una región palindrómica constituida por dos secuencias repetidas inversas de 15 pb ricas en A+T (GAAGAGAAAAACTC y GAGTTTTTCTCTTC) separadas por 5 pb y seguidas de una cola de timinas (TTTTTT). El ARNm transcrito a partir de esta secuencia adoptaría una estructura secundaria en forma de horquilla seguida de 6 residuos de uracilo. Esta horquilla tiene una energía libre de Gibbs (ΔG) de -19,8 Kcal/mol (-82.8 KJ/mol), por lo que estaría favorecida termodinámicamente y

Figura 4.27. Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina B (*entB*) de *E. faecium* T136. Identificación de las regiones relacionadas con el inicio de la transcripción y de la traducción y del hipotético terminador *rho*-independiente de la transcripción

```

1  TGTTATTCTTCATTTCAGAGTTCCCAACTGTTTGCTATAGATATATGTCCTAGTATCGTA

        SRDi
61  ATAAAATACTCTAAAAGGAGCGAGTTTAAATATGCAAAATGTAAAAGAATTAAGTACGAA
           S.D      entB  M  Q  N  V  K  E  L  S  T  K

121 AGAGATGAAACAAATTATCGGTGGAGAAAATGATCACAGAATGCCTAATGAGTTAAATAG
     E  M  K  Q  I  I  G  G  E  N  D  H  R  M  P  N  E  L  N  R
           ↑

181 ACCTAACAACTTATCTAAAGGTGGAGCAAAATGTGGTGCTGCAATTGCTGGGGGATTATT
     P  N  N  L  S  K  G  G  A  K  C  G  A  A  I  A  G  G  L  F

241 TGAATCCCAAAAGGACCACTAGCATGGGCTGCTGGGTTAGCAAATGTATACTCTAAATG
           SRDd
     G  I  P  K  G  P  L  A  W  A  A  G  L  A  N  V  Y  S  K  C

301 CAACTAAAAAGAAGAGAAAAAACTCATTACGAGTTTTTTCTCTTCTTTTTT 352
     N  *

```

Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8. Los dexosirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.21. Los números indican la posición de las bases nitrogenadas en pares de bases. ATG: codon de iniciación de la traducción correspondiente al aminoácido metionina; *, codon de terminación de la traducción (UAA). Las secuencias -35 y -10 del hipotético promotor y la secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) se han subrayado. Las secuencias repetidas directas (SRDi, izquierda; SRDd, derecha) se han suprarayado. Las secuencias palindrómicas correspondientes posiblemente a un terminador simple (*rho*-independiente) de la transcripción se indican con flechas horizontales. El punto de procesamiento de la bacteriocina está señalado con una flecha vertical.

constituiría una estructura estable que podría servir como un terminador simple (*rho*-independiente) de la transcripción de *entB* (Platt, 1986; León y García, 1992).

En las regiones que flanquean el gen estructural de la enterocina B (*entB*) se identificó un juego de secuencias repetidas directas (SRD) que consiste en dos secuencias idénticas de 10 pb (ATACTCTAAA) (Figura 4.27). La SRD izquierda (SRDi) se localiza a 17 pb del codon de iniciación de la traducción (AUG) de la pre-enterocina B y la SRD derecha (SRDd) se solapa con el extremo 3' del gen estructural, situándose 7 pb delante del codon de terminación de su traducción (UAA).

El análisis de la secuencia nucleotídica localizada delante de *entB* permitió identificar una secuencia Shine-Dalgarno muy conservada (AAGGAG), que se encuentra a una distancia óptima de 12 pb del codon de iniciación de la traducción (AUG) de la pre-enterocina B.

La secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina B y de las regiones adyacentes se encuentra registrada en la base de datos GENBANK con el número de acceso U87997.

IV.12.4. Análisis de la secuencia aminoacídica de la enterocina B y de su extensión N-terminal. Parámetros físico-químicos

A partir de la secuencia genética de la enterocina B se deduce que la bacteriocina madura contiene 53 aminoácidos, lo que coincide con el valor obtenido por hidrólisis ácida (52-54) (Tabla IV.19; sección IV.11.3); sin embargo, mediante degradación de Edman sólo se pudieron identificar los primeros 41 residuos aminoacídicos de la región N-terminal (Figura 4.23). Por otra parte, de la secuencia genética se deduce que las posiciones 22 y 23 corresponden a los aminoácidos lisina y cisteína (Lys22 y Cys23), lo cual está en discordancia con los resultados obtenidos por degradación de Edman (Ala22 y Lys23). Asimismo, el residuo aminoacídico de la posición 38, que no pudo ser determinado con certeza por degradación de Edman (Xaa38), se identificó como prolina (Pro38) (Figura 4.28).

La composición aminoacídica de la enterocina B deducida de la secuencia genética muestra una gran similitud con la obtenida por hidrólisis ácida (Tabla IV.19). Con respecto a los 11-12 residuos polares con carga neta negativa o sin carga neta (9 Asx y 2-3 Glx) detectados por hidrólisis ácida, la bacteriocina posee únicamente 3 residuos con carga neta negativa (Glu1, Glu9 y Asp3) y 7 residuos del aminoácido neutro asparragina. La bacteriocina posee, además, otros 5 residuos de aminoácidos neutros, entre los que se incluyen la cisteína (2 residuos), la serina (2) y la tirosina (1). En cuanto a los aminoácidos polares con carga neta positiva, la secuencia genética permitió identificar un residuo más de lisina, por lo que en total se incluyen en la molécula 4 residuos de lisina, 2 residuos de arginina y 1 residuo de histidina. La secuencia genética confirmó la presencia de los 23 residuos apolares detectados por hidrólisis ácida y permitió, además, identificar un residuo del aminoácido aromático triptófano (Trp41).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la enterocina B madura reveló que esta bacteriocina no contiene en su extremo N-terminal la secuencia consenso YGNGV característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina (sección II.4.1). Los principales parámetros físico-químicos de la enterocina B se muestran en la Tabla IV.22, en la que se observa que la molécula contiene un 15% de residuos de glicina, un 45% de aminoácidos apolares (de los cuales el 6% son residuos aromáticos), un 21% de aminoácidos polares neutros y el 6 y el 13% restante

Figura 4.28. Secuencia aminoacídica de la enterocina B y de la enterocina A de *E. faecium* T136 obtenidas por degradación de Edman y por secuenciación genética

ENTEROCINA B Degradación de Edman

Secuenciación genética

ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAAKGAAGGLFGIPKGXLAW⁺⁴¹

MQNVKELSTKEMKQIIGG⁻¹⁸ ↓⁺¹ ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN⁺⁵³

ENTEROCINA A Degradación de Edman

Secuenciación genética

XTHSGKYYGNGVYXTKNK⁺¹⁸

LIYGG⁻⁵ ↓⁺¹ TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGKC⁺⁴⁷

Código monosílabo de los aminoácidos y símbolos como en la Figura 4.8. Los aminoácidos en cursiva no se pudieron determinar por degradación de Edman o su identificación no coincidió con la deducida de la secuencia genética. El punto de procesamiento de las preproenterocinas se indica con una flecha vertical. Los números negativos indican los límites de las extensiones N-terminales de las preproenterocinas y los números positivos corresponden a las bacteriocinas. La secuencia consenso de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina se ha subrayado.

Tabla IV.22. Parámetros físico-químicos de la enterocina B y de su extensión N-terminal (secuencia líder del tipo doble glicina) y de la enterocina A y de su extensión N-terminal (secuencia líder del tipo doble glicina), producidas por *E. faecium* T136

| | Pm (Da) | Nº aa | % de aminoácidos | | | | | | Aminoácidos ausentes | Carga neta ^a | pI | Índice GRAVY | Nº PTHs |
|------------------------------|------------|----------|------------------|----|----|---------|----|----|----------------------------|----------------------------|------|-----------------|------------|
| | | | apolares | | | polares | | | | | | | |
| | | | Gly | Af | Ar | Nt | Ac | Bs | | | | | |
| ENTEROCINA B | 5.465 | 53 | 15 | 39 | 6 | 21 | 6 | 13 | Q, T | 3 | 9,7 | -3,8 | 1 |
| SECUENCIA LÍDER | 2.034 | 18 | 11 | 33 | 0 | 28 | 11 | 17 | A, P, F, W, Y, C, D, R, H | 1 | 9,7 | -5,9 | 0 |
| ENTEROCINA A | 4.833 | 47 | 19 | 25 | 11 | 30 | 2 | 13 | Q, E, R | 4 | 9,0 | -0,3 | 1 |
| SECUENCIA LÍDER ^b | 2.073 | 18 | 11 | 39 | 5 | 17 | 6 | 22 | A, V, P, W, F, N, C, D, R, | 2 | 10,2 | +0,7 | 0 |

^aCarga neta a pH 7.0.

^bLos parámetros físico-químicos de la secuencia líder de la enterocina A se determinaron a partir de la secuencia aminoacídica obtenida por Aymerich *et al.* (1996). Símbolos y abreviaturas como en la Tabla IV.16. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

lo constituyen aminoácidos ácidos y básicos, respectivamente. La enterocina B es una proteína de 53 aminoácidos estable, periférica, catiónica (carga neta 3, a pH 7,0), de elevado pI (9,7), hidrófoba (Índice GRAVY de -3,8) y con un tamaño molecular teórico de 5.465 Da. El extremo N-terminal de la bacteriocina (hasta el residuo 24) es muy hidrófilo (índice GRAVY de -16,42), mientras que la región C-terminal es muy hidrófoba (índice GRAVY de +6,72) y contiene una posible hélice α transmembrana (PTH) de 21 aminoácidos, entre los residuos 25 (Ala) y 45 (Leu) (índice GRAVY de +11,42), según el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984).

El análisis de la extensión N-terminal de 18 aminoácidos de la enterocina B (Figura 4.28) permitió observar que: (i) las posiciones -15, -12, -7 y -4 están ocupadas por los residuos aminoacídicos hidrófobos valina, leucina, metionina e isoleucina (Val-15, Leu-12, Met-7 e Ile-4), (ii) las posiciones -11, -9 y -8 están ocupadas por el residuo polar neutro serina y por los residuos polares con carga lisina y ácido glutámico (Ser-11, Lys-9 y Glu-8) y (iii) las posiciones -2 y -1 están ocupadas por el aminoácido glicina (Gly-2 y Gly-1). Estas características de la extensión N-terminal de la enterocina B concuerdan con los criterios establecidos por Fremaux *et al.* (1993) y Havarstein *et al.* (1994) (sección II.4.6) para las secuencias líder del tipo doble glicina que contienen las bacteriocinas que se procesan y secretan mediante una ruta de secreción independiente de un péptido señal (sistema *sec*-independiente) en la que intervienen transportadores ABC específicos y sus proteínas accesorias (Wandersman, 1992; Fath y Kolter 1993; Havarstein *et al.*, 1995a; Franke *et al.*, 1996) (Figura 2.2; sección II.4.7). Los parámetros físico-químicos más relevantes de la secuencia líder del tipo doble glicina de la enterocina B se muestran en la Tabla IV.22, en la que se observa que la molécula contiene un 11% de residuos de glicina, un 33% de aminoácidos apolares, entre los que no se incluye ningún aminoácido aromático, un 28% de aminoácidos polares neutros y el restante 28% está constituido por aminoácidos polares con carga neta negativa (11%) o positiva (17%). Esta secuencia líder es estable, periférica, catiónica (carga neta 1, a pH 7,0), de elevado pI (9,7), presenta un índice GRAVY de -5,9 y un tamaño molecular teórico de 2.034 Da. De acuerdo con los programas HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984) y SOAP (Klein *et al.*, 1985), la molécula no contiene segmentos transmembrana.

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede concluir que la enterocina B de *E. faecium* T136 es una nueva bacteriocina *sec*-independiente que no es del tipo pediocina, es decir, una sustancia antimicrobiana que se sintetiza en los ribosomas en forma de un prepropéptido o precursor inactivo (preproenterocina B) que contiene una secuencia líder del tipo doble glicina que es reconocida por el transportador ABC de la bacteriocina y procesada por éste concomitantemente con la secreción de la enterocina B.

IV.12.5. Secuenciación parcial del gen estructural de la enterocina A

Dado que mediante degradación de Edman sólo se pudieron identificar los primeros 18 aminoácidos del extremo N-terminal de la enterocina A de *E. faecium* T136 se procedió a determinar la secuencia nucleotídica de su gen estructural para confirmar genéticamente la identidad de esta bacteriocina con la enterocina A de *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996). La secuencia nucleotídica del fragmento de 187 pb que contiene una región del gen estructural de la enterocina A (*entA*) se determinó secuenciando un fragmento de

PCR mediante el método enzimático de Sanger o método didesoxi de finalización de cadena, como se describió en la sección III.2.11.10. El cebador ENT1 empleado en las experiencias de PCR y de secuenciación corresponde al cebador TH10 (Aymerich *et al.*, 1996), específico de la secuencia líder de la enterocina A de *E. faecium* CTC4932. La secuencia y la dirección de ENT1 (TH10), su temperatura de fusión y su localización con respecto a la secuencia líder de la bacteriocina se muestra en la Tabla IV.21.

El ADN total de *E. faecium* T136 se trató con el enzima de restricción *EcoRI* (sección III.2.11.3) y los fragmentos obtenidos se ligaron en el fagémido pBluescript II SK+, previamente tratado con *EcoRI* (secciones III.2.11.4.2 y III.2.11.5). A continuación, se realizaron tres PCRs hemiespecíficos (sección III.2.11.6.3) empleando como ADN molde esta mezcla de ligación y las obtenidas anteriormente (*DraI* y *HincII*) (sección IV.12.2.2) y, como cebadores, el oligonucleótido específico ENT1 y SK2 biotinizado en su extremo 5'. La hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización se efectuó a 72°C durante 2 min. Tras realizar la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% (p/v), en el producto correspondiente a la ligación *EcoRI* se visualizó un único fragmento de 1,8 Kb, lo que permitió su purificación directamente a partir del producto de PCR. Posteriormente, el fragmento se convirtió a cadena sencilla y se secuenció la hebra positiva empleando ENT1 como cebador de secuenciación. Tras realizar la autorradiografía correspondiente, se solaparon las secuencias obtenidas con las dos carreras electroforéticas y se obtuvo la secuencia de los 187 nucleótidos del extremo 3' del gen estructural de la enterocina A que se muestra en la Figura 4.29.

IV.12.6. Análisis del gen estructural de la enterocina A y de la región adyacente. Parámetros físico-químicos de la enterocina A

La secuencia nucleotídica de 187 pb obtenida mediante la secuenciación del producto de PCR 1,8 Kb-*EcoRI* de *E. faecium* T136 contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) incompletos con la misma polaridad (hebra 5'-3'), denominados *entA* y *orf2* (Figura 4.29).

El fragmento secuenciado del gen estructural de la enterocina A (*entA*) codifica una secuencia de 52 aminoácidos que, al compararse con la obtenida para la bacteriocina por degradación de Edman, permite establecer que la enterocina A se sintetiza como un precursor o prepeptido (preproenterocina A) que contiene un extensión N-terminal, de la que únicamente se determinaron los 5 residuos del extremo C-terminal (Figura 4.28). El punto de procesamiento del prepeptido se sitúa inmediatamente después de los dos residuos de glicina consecutivos (posiciones -2 y -1) de la extensión N-terminal, lo que da lugar a un péptido de 47 aminoácidos (enterocina A madura) con un tamaño molecular teórico de 4.833 Da. La secuencia aminoacídica deducida de la secuencia genética confirmó la secuencia parcial obtenida por degradación de Edman y permitió identificar los residuos de las posiciones 1 (Thr1) y 14 (Cys14). La secuencia aminoacídica de la bacteriocina resultó ser idéntica a la de la enterocina A de *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

Los parámetros físico-químicos más relevantes de la enterocina A se muestran en la Tabla IV.22, en la que se observa que la molécula contiene un 19% de residuos de glicina, un 36% de aminoácidos apolares (de los cuales el 11% son residuos aromáticos), un 30% de aminoácidos polares neutros y el 2 y el 13% restante lo constituyen residuos aminoacídicos ácidos y básicos,

Figura 4.29. Secuencia nucleotídica parcial del gen estructural de la enterocina A (*entA*) de *E. faecium* T136

entA

1 AACTTATCTATGGGGGTACCACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAATGGAGTGTATTGCA
 L I Y G G T T H S G K Y Y G N G V Y C T
 †

61 CTAAAAATAAATGTACGGTCGATTGGGCCAAGGCAACTACTTGTATTGCAGGAATGTCTA
 K N K C T V D W A K A T T C I A G M S I

S.D. ***orf2***

121 TAGGTGGTTTTTTAGGTGGAGCAATTCCAGGGAAGTGCTAAATGAAAAAATGCTAA
 G G F L G G A I P G K C * M K K N A K

181 GCAAATT 187
 Q I

Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8. Los dextrirribonucleótidos se indican como en la Tabla IV.21. Los números indican la posición de las bases nitrogenadas en pares de bases. *, codon de terminación de la traducción (UAA). La secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) se ha subrayado. El punto de procesamiento de la bacteriocina está señalado con una flecha vertical.

respectivamente. La enterocina A es una proteína periférica, estable, catiónica (carga neta 4, a pH 7,0), de elevado pI (9,0) e hidrófoba (Índice GRAVY de -0,3). El extremo N-terminal de la bacteriocina (hasta el residuo 22) es bastante hidrófilo (índice GRAVY de -9,41), mientras que la región C-terminal es muy hidrófoba (índice GRAVY de +7,72) y contiene una posible hélice α transmembrana (PTH) de 21 aminoácidos, entre los residuos 23 (Trp) y 43 (Ile) (índice GRAVY de +10,8), según el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984).

La extensión N-terminal de la enterocina A de *E. faecium* T136 no se secuenció completamente; no obstante, la presencia de dos residuos consecutivos de glicina inmediatamente antes del punto de procesamiento de la pre-enterocina A (Gly-2 y Gly-1) (Figura 4.29) sugiere que se trata de una secuencia líder del tipo doble glicina (Fremaux *et al.*, 1993; Havarstein *et al.*, 1994), como se ha demostrado para la enterocina A de *E. faecium* CECT492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996). Por lo tanto, la enterocina A de *E. faecium* T136 es una bacteriocina del tipo pediocina que, al igual que la enterocina B de *E. faecium* T136, se procesa y secreta mediante una ruta de secreción independiente de un péptido señal (sistema *sec*-independiente) en la que intervienen transportadores ABC específicos y sus proteínas accesorias (Figura 2.2; sección II.4.7).

Inmediatamente después del codón de terminación de la traducción (UAA) de la enterocina A, se localiza el inicio de un segundo marco de lectura abierto (ORF), denominado *orf2*, que codifica los primeros 8 residuos del extremo N-terminal de una cadena peptídica (ORF2). El análisis de la secuencia nucleotídica localizada delante de *orf2* permitió identificar una secuencia Shine-Dalgarno (AGGG), que se encuentra a una distancia óptima de 10 pb del codón de iniciación de la traducción (AUG) de ORF2. La secuencia aminoacídica parcial del ORF2 de *E. faecium* T136 resultó ser idéntica al extremo N-terminal de la hipotética proteína de inmunidad (ORF2) de la enterocina A de *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

IV.12.7. Amplificación por PCR de los genes estructurales de la enterocina B y de la enterocina A de *E. faecium* T136 y *E. faecium* CTC492

Los resultados anteriores demuestran inequívocamente que *E. faecium* T136 produce la enterocina B, una nueva bacteriocina de la clase II no del tipo pediocina y, además, la enterocina A, una bacteriocina de la clase II del tipo pediocina que había sido previamente aislada de *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996). Con el objeto de visualizar los genes estructurales de las enterocinas B y A se realizó un PCR específico empleando como ADN molde el ADN total de *E. faecium* T136 y, como cebadores, las parejas ENTA1(TH10)/ENTA2 y ENTB3/ENTB5. La hibridación se realizó a 55°C durante 30 seg y la polimerización a 72°C durante 45 seg. Los resultados obtenidos tras realizar la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% (p/v) se muestran en la Figura 4.30, en la que se observan dos únicos fragmentos de 126 y 171 pb. De acuerdo con la localización de los cebadores empleados (Tabla IV.21), los fragmentos amplificados de 126 y 171 pb contienen un fragmento del gen estructural de la enterocina B y de la enterocina A, respectivamente.

Por otra parte, se realizó una reacción de amplificación similar, empleando como ADN molde el ADN total de *E. faecium* CTC492, con el objeto de amplificar el gen estructural de la enterocina A y de determinar si esta cepa contiene también el gen estructural de la enterocina B.

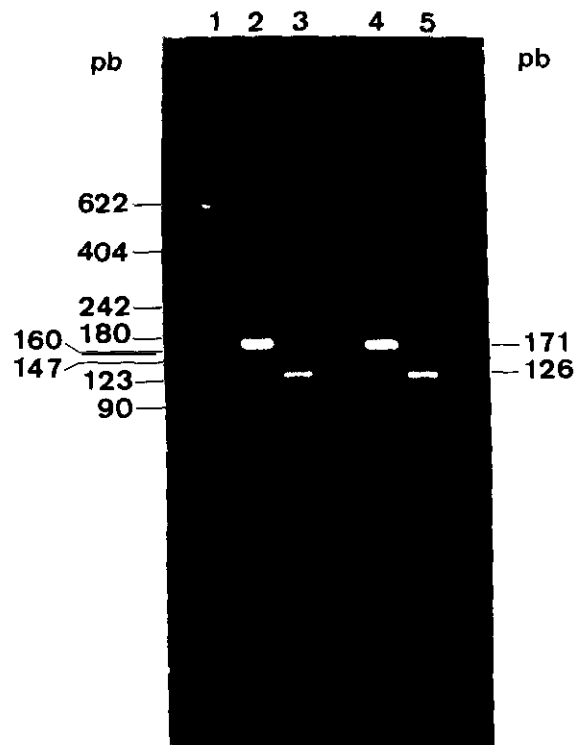


Figura 4.30. Electroforesis en gel de agarosa de los genes estructurales de la enterocina B y de la enterocina A de *E. faecium* T136 (2 y 3) y *E. faecium* CTC492 (4 y 5) amplificados por PCR. En la columna 1 se muestran los marcadores del tamaño molecular de los fragmentos lineales de ADN.

Como se observa en la Figura 4.30 se obtuvieron los mismos resultados que cuando se empleo el ADN total de *E. faecium* T136. Estos resultados permiten concluir que *E. faecium* CTC492 posee también el gen estructural de la enterocina B y experiencias bioquímicas realizadas al margen de este trabajo demuestran su producción en esta cepa y su liberación al medio exocelular (Nilsen *et al.*, 1998).

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN

V.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENICAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ELABORADOS ARTESANALMENTE

Los embutidos crudos curados se seleccionaron como fuente para el aislamiento de bacterias lácticas ya que se trata de un tipo de productos cárnicos que goza de una calidad higiénica excepcional y cuya flora predominante está constituida por estos microorganismos (Lücke, 1987; Egan y Roberts, 1987; Schillinger y Lücke, 1987, 1989; Rodríguez, 1991; Garriga *et al.*, 1993b; Vignolo *et al.*, 1993; Moreira 1993; Sobrino, 1993; Vaughan *et al.*, 1994; Cintas, 1995). Asimismo, las bacterias lácticas procedentes de estos productos están mejor adaptadas a la ecología microbiana de la carne y de los derivados cárnicos que las aisladas de otras fuentes como, entre otras, la leche, los productos lácteos y las hortalizas (Schillinger y Lücke, 1989). Por otra parte, los embutidos crudos curados empleados en este trabajo fueron elaborados de un modo artesanal, según las costumbres gastronómicas características del lugar de procedencia, para evitar aislar bacterias lácticas empleadas habitualmente en la industria cárnica como cultivos iniciadores o protectores.

El aislamiento de las bacterias lácticas se realizó empleando el medio selectivo MRS (De Man *et al.*, 1960), una temperatura y un tiempo de incubación de 32°C y 3 días, respectivamente, y condiciones atmosféricas de microaerofilia, ya que todos estos factores favorecen el crecimiento de las bacterias lácticas frente al de otros microorganismos presentes potencialmente en la microflora de los embutidos (Reuter, 1985).

V.1.1. Actividad antimicrobiana en medio sólido de las bacterias lácticas aisladas

El estudio inicial de la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas se realiza generalmente en medios de cultivo sólidos o semisólidos, mediante ensayos que se dividen en directos o simultáneos e indirectos o diferidos (Hoover, 1993). En ambos casos, la actividad antimicrobiana ejercida por el microorganismo problema (activo) se detecta como una inhibición del crecimiento del microorganismo indicador (pasivo) (Tagg *et al.*, 1976). En los ensayos directos, el microorganismo problema y el microorganismo indicador se desarrollan simultáneamente bajo las mismas condiciones de incubación, por lo que la inhibición se detectará únicamente en el caso de que las sustancias antimicrobianas se sintetizen y se liberen al medio exocelular durante los primeros estadios del crecimiento del microorganismo problema (Gratia, 1946). En los ensayos indirectos o en diferido, el microorganismo problema se cultiva en un medio sólido, durante un periodo de tiempo determinado y, a continuación, se cubre con una capa de medio semisólido fundido y atemperado que contiene el microorganismo indicador (Frederick, 1948). Algunos autores antes de añadir el microorganismo indicador inactivan las células del microorganismo problema con calor (Ahn y Stiles, 1990a) o con vapores de cloroformo (Davey y Richardson, 1981). Otros autores añaden el cultivo del microorganismo problema sobre membranas estériles depositadas en una capa de agar estéril y, tras un periodo de incubación determinado, las retiran y depositan el microorganismo indicador diluido en un agar semisólido fundido y atemperado (Vlaemynck *et al.*, 1994). Los ensayos en diferido son más sensibles que los simultáneos y permiten que tanto el microorganismo problema como el

indicador se desarrollen bajo condiciones óptimas de incubación (Tagg *et al.*, 1976).

Entre los métodos más utilizados se encuentra el método de antagonismo microbiano indirecto de la “gota sobre agar”, descrito por Fleming *et al.* (1975). Esta prueba consiste en sembrar una gota del cultivo del microorganismo problema sobre una capa de agar estéril y, una vez desarrolladas las colonias, depositar el microorganismo indicador diluido en un agar semisólido fundido y atemperado (Geis *et al.*, 1983; Schillinger y Lücke, 1989; Arihara *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 1993b; Lauková *et al.*, 1993; Vignolo *et al.*, 1993; Villani *et al.*, 1993; Ben Embarek *et al.*, 1994; González *et al.*, 1994; Aymerich, 1996). Otros investigadores realizan la variante directa de este método que consiste en sembrar una gota del cultivo del microorganismo problema sobre una capa de agar en la que previamente se había inoculado el microorganismo indicador e incubar posteriormente las placas (Davey y Richardson, 1981). Una variante de este método propuesta por Sabine (1963) consiste en realizar pocillos en la capa de agar semisólido que contiene el microorganismo indicador y, posteriormente, rellenarlos con un determinado volumen del microorganismo problema en medio líquido o semisólido (Ben Embarek *et al.*, 1994).

Otro de los métodos más empleados es el método de antagonismo microbiano directo por siembra en profundidad por picadura, descrito por De Klerk (1967). Barefoot y Klaenhammer (1983) inoculan el microorganismo problema por siembra en picadura sobre una capa de agar semisólido en la que previamente se había sembrado el microorganismo indicador y, posteriormente, incuban las placas. Otros investigadores emplean la variante indirecta de este método, que consiste en incubar durante un tiempo variable el microorganismo problema sembrado por picadura antes de añadir el agar semisólido con el microorganismo indicador (Davey y Richardson, 1981; Holo *et al.*, 1991; Rodríguez, 1991; Moreira, 1993; Ruiz-Barba *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1996).

Dentro de los ensayos indirectos destacan el método “*flip-plating*” (Kékessy y Pigué, 1970) y el método “*sandwich*” (Mayr-Harting *et al.*, 1972), basados ambos en la difusión tridimensional de las sustancias antimicrobianas y en la separación física del microorganismo problema e indicador. En el método “*flip-plating*”, el microorganismo problema se siembra sobre una placa de agar estéril por alguno de estos procedimientos: (i) depositando una gota del cultivo, (ii) añadiendo un medio semisólido que lo contenga a una concentración que permita visualizar colonias aisladas o (iii) extendiendo una gota del cultivo siguiendo el diámetro de la placa. Tras incubar el microorganismo problema se invierte la capa de agar y se siembra el microorganismo indicador, bien añadiendo una capa de agar semisólido que lo contenga (i y ii) o bien extendiendo una gota de cultivo en dirección perpendicular a la del microorganismo problema (iii) (Barefoot y Klaenhammer, 1983). En el método “*sandwich*” se siembran diluciones adecuadas del microorganismo problema sobre una capa de agar estéril y, a continuación, se cubren las placas con una capa de medio semisólido y se incuban; una vez desarrolladas las colonias, se añade una capa de medio semisólido fundido que contiene el microorganismo indicador (Mortvedt y Nes, 1990). Una de las principales ventajas de estos métodos es que en ellos se excluye la actividad inhibidora debida a los bacteriófagos ya que éstos no difunden por la capa de agar (Hoover, 1993).

En este trabajo, el estudio inicial de la actividad antimicrobiana en medio sólido de las

bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados se llevó a cabo mediante un método de antagonismo microbiano diferido por siembra en picadura (sección III.2.3.1). Este método presenta las ventajas de los ensayos en diferido; es decir, permite que tanto el microorganismo problema como el indicador se desarrollen bajo condiciones óptimas de incubación y que las colonias del microorganismo problema inicien su crecimiento y la producción de sustancias antimicrobianas antes de que empiece a desarrollarse el microorganismo indicador. Por otra parte, es una técnica más rápida que el método de la gota sobre agar, ya que permite establecer simultáneamente la actividad antimicrobiana de un gran número de colonias sin necesidad de cultivarlas previamente en medio líquido.

De las 768 colonias preseleccionadas al azar de los 8 embutidos, 46 (28 de morfología cocoide y 18 de morfología bacilar), es decir el 6%, mostraron halos de actividad antimicrobiana de diámetro superior a 4 mm frente a uno, al menos, de los microorganismos indicadores utilizados (*P. acidilactici* 347, *Lb. sake* 148 y *Ls. monocytogenes* ScottA) (Tabla IV.1; sección IV.1). *P. acidilactici* 347 y *Lb. sake* 148 se emplearon como microorganismos indicadores porque producen dos bacteriocinas ampliamente distribuidas entre las bacterias lácticas: la pediocina PA-1 (Bhunia *et al.*, 1987; González y Kunka, 1987; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Moreira, 1993; Cintas *et al.*, 1993; Ennahar *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1997a; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) y la lactocina S (Mortvedt y Nes, 1990; Sobrino, 1993; Cintas *et al.*, 1993; Cintas, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995b; Cintas *et al.*, 1998a), respectivamente. *Ls. monocytogenes* Scott A se empleó por tratarse de una bacteria patógena Gram-positiva responsable de numerosos brotes de toxiinfecciones alimentarias registrados en los últimos años (Farber y Peterkin, 1991; Lepoutre *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos por otros investigadores que han estudiado la actividad inhibidora de las bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados son variables. Así, por ejemplo, Schillinger y Lücke (1989) estudiaron 142 cepas de *Lb. sake*, 4 de *Lb. plantarum* y 75 de *Lb. curvatus*, encontrando que el 13, el 75 y el 1%, respectivamente, inhibían el crecimiento de uno, al menos, de los 31 microorganismos indicadores utilizados. Garriga *et al.* (1993b) evaluaron 254 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de embutidos crudos curados (Hugas *et al.*, 1993) y observaron que 55 de ellas mostraban actividad inhibidora frente a, al menos, uno de los 5 microorganismos indicadores utilizados. González *et al.* (1994) analizaron 75 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de diversos productos fermentados y detectaron que el 13% inhibían el crecimiento de alguno de los microorganismos indicadores. Cintas (1995) observó que de 500 colonias aisladas de 5 embutidos crudos curados, el 11% mostraba actividad antimicrobiana frente a uno, al menos, de los tres microorganismos indicadores empleados. La variabilidad en los porcentajes globales de incidencia de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en los alimentos puede deberse a que los resultados obtenidos dependen: (i) de los microorganismos indicadores empleados, (ii) de las condiciones experimentales establecidas para evaluar dicha actividad y (iii) de los criterios adoptados para interpretar los resultados.

V.1.2. Identificación y selección de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en medio líquido

Las bacterias lácticas producen numerosos compuestos antimicrobianos (sección II.2.4), por

lo que la identificación de aquéllas cuya actividad antimicrobiana se deba a la producción y liberación de bacteriocinas al medio exocelular requiere el empleo de métodos complementarios a los expuestos anteriormente que excluyan el efecto inhibitor debido a otros compuestos antimicrobianos (ej. ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno), a la deplección de nutrientes del medio y/o a la presencia de bacteriófagos.

Uno de los métodos empleados consiste en desarrollar el microorganismo problema en un medio líquido bajo condiciones de incubación adecuadas y, seguidamente, aplicar diversos procedimientos que permitan obtener un sobrenadante libre de células cuya actividad antimicrobiana se deba, al menos presumiblemente, a la presencia de bacteriocinas. Entre los procedimientos empleados para eliminar la presencia de bacteriófagos y/o de células residuales destacan la esterilización de los sobrenadantes por filtración con filtros de 0,22 μm de poro (Tagg *et al.*, 1976; Arihara *et al.*, 1993; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Moreira, 1993; Sobrino, 1993; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a,b) y la inactivación de los bacteriófagos exponiendo el medio de cultivo a luz ultravioleta (Mayr-Harting *et al.*, 1972). La actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno se puede eliminar incubando el microorganismo problema en condiciones de anaerobiosis estricta (Aymerich, 1996), o bien, en un medio de cultivo con efecto catalásico, como el MRS (Rodríguez *et al.*, 1997b), o en uno al que se le adiciona catalasa (Geis *et al.*, 1983; Vlaemynek *et al.*, 1994; Torri Tarelli *et al.*, 1994). Otros autores añaden la catalasa directamente a los sobrenadantes libres de células (Ahn y Stiles, 1990a; Arihara *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994; Cintas *et al.*, 1998a). El efecto inhibitor debido al descenso del pH del medio de cultivo se elimina mediante la adición de una solución básica fuerte (Schillinger y Lücke, 1989; Arihara *et al.*, 1993; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Ben Embarek *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a). La actividad antagonista debida a los ácidos orgánicos y a otros compuestos antimicrobianos de pequeño tamaño molecular se puede eliminar mediante diálisis del sobrenadante libre de células frente al polietilenglicol (Daeschel *et al.*, 1990); algunos autores como paso previo a la diálisis obtienen las proteínas de los sobrenadantes libres de células por precipitación con sulfato amónico (Bhunja *et al.*, 1987). Alternativamente, la producción de ácido se puede minimizar realizando la incubación del microorganismo problema en un medio de cultivo pobre en hidratos de carbono fermentables (Vaughan *et al.*, 1994). Los sobrenadantes libres de células tratados con los procedimientos anteriores se pueden concentrar, para aumentar su actividad antimicrobiana, mediante liofilización (Moreira, 1993; Sobrino, 1993; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a), ultrafiltración (Lauková *et al.*, 1993; Olasupo *et al.*, 1994) o evaporación a vacío y con calor en rotavapores (Geis *et al.*, 1983).

La evaluación de la actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes libres de células y/o sobrenadantes concentrados se lleva a cabo mediante pruebas basadas en la difusión tridimensional de las bacteriocinas en un medio sólido o semisólido y en la inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores (Hoover, 1993). Las pruebas más utilizadas son modificaciones de la técnica de difusión en agar descrita por Schillinger y Lücke (1989). Así, pues, algunos autores depositan alícuotas de los sobrenadantes a evaluar en pocillos practicados en una capa de agar semisólido en la que previamente se había inoculado el microorganismo indicador y, antes de proceder a la incubación de las placas, éstas se preincuban a temperaturas de refrigeración para permitir la difusión de las bacteriocinas (González *et al.*, 1994; Cintas,

1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a). Otros autores practican pocillos en una capa de agar estéril y, tras tapizar su fondo con unas gotas del mismo medio, depositan en ellos las alícuotas de los sobrenadantes a evaluar; posteriormente, se preincuban las placas para permitir la difusión de las bacteriocinas y, a continuación, se invierte la capa de agar y se añade una capa de medio semisólido que contiene el microorganismo indicador (Ahn y Stiles, 1990a). Por último, algunos investigadores añaden las alícuotas de los sobrenadantes sobre discos de papel de filtro estériles (Bhunja *et al.*, 1988; Rodríguez, 1991; Sobrino, 1993) o directamente sobre el medio semisólido que contiene el microorganismo indicador (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Rufz-Barba *et al.*, 1994). En todas las pruebas descritas anteriormente el tamaño del halo de inhibición depende de la tasa de difusión de la bacteriocina y del crecimiento del microorganismo indicador (Linton, 1983). Estos parámetros están determinados a su vez por el tipo de medio de cultivo, por los tiempos y temperaturas de preincubación e incubación y por las concentraciones empleadas de microorganismo indicador y bacteriocina (Davidson y Parish, 1989). Debido a la importancia de todos estos factores es necesario estandarizar las condiciones experimentales para poder así comparar la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a).

La identificación de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas aisladas en este trabajo se llevó a cabo empleando una modificación de la técnica de difusión en agar descrita por Schillinger y Lücke (1989). Mediante esta técnica se evaluó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células neutralizados y esterilizados por filtración, así como de los sobrenadantes concentrados veinte veces por liofilización, frente a diversos microorganismos indicadores (sección III. 2.3.2.). Esta misma metodología ha sido empleada por otros autores para detectar la actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas (Moreira, 1993; Villani *et al.*, 1993; Ten Brink *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a). En las experiencias realizadas en este trabajo siempre se practicaron pocillos del mismo diámetro (6 mm) y siempre se empleó la misma cantidad de sobrenadantes y de sobrenadantes concentrados (50 μ l) obtenidos de cultivos en fase estacionaria (16 h a 32°C), la misma densidad inicial de microorganismos indicadores (1×10^5 ufc/ml, aproximadamente) y los mismos tiempos y temperaturas de preincubación de las sustancias antimicrobianas (2 h a 4°C). Por otra parte, los microorganismos indicadores se cultivaron siempre durante 24 h en los medios de cultivo óptimos y bajo las condiciones más favorables para su crecimiento (Tabla III.1; sección III.1.1).

De las 46 bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en medio sólido, 12 (9 de morfología cocoide y 3 de morfología bacilar), es decir el 26%, mostraron actividad antimicrobiana en medio líquido frente a uno, al menos, de los tres microorganismos indicadores empleados (Tabla IV.1; sección IV.1 y Tabla IV.2; sección IV.2). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores. Así, pues, Schillinger y Lücke (1989) observaron que de las 23 cepas de *Lactobacillus* spp. que mostraban actividad en medio sólido, el 26% eran activas cuando se empleaban los correspondientes sobrenadantes. Asimismo, González *et al.* (1994) encontraron que el 30% de las cepas de *Lactobacillus* spp. con actividad inhibidora en medio sólido la mantenían cuando se desarrollaban en un medio de cultivo líquido. Cintas (1995) observó que de las 55 cepas que mostraban actividad en medio sólido, solamente el 22% eran activas cuando se emplearon sus correspondientes sobrenadantes. Por último, Garriga *et al.*

(1993b) obtuvieron porcentajes inferiores, ya que de 55 cepas de *Lactobacillus* spp. con actividad antagonista en medio sólido, sólo un 11% mostraban actividad en los sobrenadantes.

El hecho de que las otras 34 bacterias lácticas aisladas en este trabajo que mostraban actividad antimicrobiana en medio sólido no la presenten en los sobrenadantes libres de células neutralizados, ni en los correspondientes sobrenadantes concentrados, puede deberse a que (i) la actividad antimicrobiana detectada en la técnica de antagonismo microbiano por siembra en picadura sea debida a la deplección de nutrientes y/o al descenso del pH del medio de cultivo, (ii) a que únicamente produzcan y/o liberen compuestos antimicrobianos cuando se desarrollan en medio sólido, (iii) a que los compuestos antimicrobianos producidos en medio líquido no sean activos a los valores de pH neutros a lo que se ajustaron los sobrenadantes o (iv) a que las sustancias con actividad antimicrobiana se sintetizen durante la fase exponencial del crecimiento en medio líquido y se degraden en la fase estacionaria.

V.1.3. Caracterización microbiológica y bioquímica de las 12 bacterias lácticas seleccionadas. Filiación taxonómica

Las 12 bacterias lácticas con actividad bacteriocinogénica seleccionadas en este trabajo se caracterizaron atendiendo a diversas pruebas microbiológicas y bioquímicas empleadas habitualmente para este grupo de microorganismos (Tablas IV.5 y IV.6; sección IV.5) y, posteriormente, se analizó su patrón electroforético de proteínas totales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (sección IV. 6). La comparación mediante programas informáticos (Vauterin y Vauterin, 1992) de los patrones de proteínas totales obtenidos por SDS-PAGE estandarizadas se ha revelado como una estrategia muy eficaz para establecer el agrupamiento y la clasificación taxonómica de especies bacterianas relacionadas filogenéticamente (Kersters y de Ley, 1975; Pot *et al.*, 1994a; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a; Devriese *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado una estrecha correlación entre la similitud de estos patrones electroforéticos y los resultados de los estudios de hibridación ADN:ADN (Vandamme *et al.*, 1996). No obstante, la principal desventaja de esta técnica radica en el hecho de que únicamente aporta información discriminatoria a los niveles de especie y subespecie, por lo que previamente es necesario disponer de características microbiológicas y bioquímicas que permitan establecer una preidentificación de la cepa a analizar a nivel de género. En este contexto, los resultados de las pruebas microbiológicas y bioquímicas a las que se sometieron las 12 bacterias lácticas seleccionadas permitieron la asignación del género y, aunque de forma tentativa, de la especie (sección IV.5). La comparación de sus patrones electroforéticos de proteínas totales con los de las cepas de referencia disponibles en una base de datos de más de 7.000 bacterias lácticas permitió, de acuerdo con las técnicas de Kersters y de Ley (1975) y Pot *et al.* (1993), asignar taxativamente su especie. Así, pues, las 12 bacterias lácticas seleccionadas se clasificaron taxonómicamente como *P. acidilactici* A172, *P. acidilactici* P20, *P. acidilactici* X13, *L. lactis* subesp. *lactis* G18, *E. faecium* P13, *E. faecium* P21, *E. faecium* T136, *E. faecium*-atípico G16, *E. faecium*-atípico AA13, *Lb. sake*-atípico B18, *Lb. sake*-atípico S124 y *Lb. plantarum* AA24. Del análisis del dendograma obtenido (Figura 4.1; sección IV.6) se desprende que *P. acidilactici* A172, *P. acidilactici* P20 y *P. acidilactici* X13 muestran una gran similitud en su

patrón electroforético (91-94%), así como con la cepa productora de pediocina PA-1 *P. acidilactici* 347 (89% de similitud), aislada también de embutidos crudos curados (Moreira, 1993). *L. lactis* G18 muestra un patrón prácticamente igual (98% de similitud) que la cepa *L. lactis* BB24 productora de nisina A, aislada de embutidos crudos curados por Cintas (1995). En lo que respecta a las cinco cepas de *E. faecium*, se pueden establecer dos grupos de similitud bien diferenciados: *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136 muestran una similitud del 93% y *E. faecium*-atípico G16, *E. faecium*-atípico AA13 y *E. faecium* P13 manifiestan una similitud del 89%; asimismo, la homología entre ambos grupos es del 82%. Por otra parte, el grupo *E. faecium* P21/*E. faecium* T136 muestra una similitud del 87% con las cepas *E. faecium* L50 y *E. faecium* E27 productoras de enterocinas L50A y L50B, aisladas de embutidos crudos curados (Cintas 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998b), mientras que en el caso del grupo *E. faecium*-atípico G16/*E. faecium*-atípico AA13/ *E. faecium* P13 esta similitud disminuye al 82%. En lo que respecta a los lactobacilos, *Lb. sake*-atípico S124 y *Lb. sake*-atípico B18 muestran una homología del 87%; asimismo, estos microorganismos muestran una homología de 97 y del 88%, respectivamente, con la cepa *Lb. sake* 148 productora de lactocina S, aislada de embutidos crudos curados (Sobrino *et al.*, 1992; Sobrino, 1993).

El aislamiento de microorganismos de las especies *Lb. plantarum*, *Lb. sake* y *P. acidilactici* a partir de embutidos crudos curados elaborados sin adición de cultivos iniciadores no resulta sorprendente pues los lactobacilos, y en menor medida los pediococos, constituyen la flora láctica predominante de este tipo de productos debido, entre otras causas, a su adaptación a los bajos pHs y a la producción de sustancias antimicrobianas (Smith y Palumbo, 1981; Bacus y Brown, 1985; Hammes *et al.*, 1990; Hugas *et al.*, 1993; Flores, 1994; Samelis *et al.*, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995). En este contexto, algunos autores han llegado a sugerir que *Lb. sake* podría llegar a convertirse en la especie predominante a las temperaturas de maduración empleadas normalmente en Europa para la elaboración de embutidos crudos curados (Lücke, 1987; Lücke y Hechelmann, 1987). Asimismo, numerosos trabajos describen el aislamiento de cepas bacteriocinogénicas de las especies *Lb. sake* (Schillinger y Lücke, 1989; Mortvedt y Nes, 1990; Rodríguez, 1991; Sobrino *et al.*, 1992; Tichacek *et al.*, 1992; Garriga *et al.*, 1993b; Hugas *et al.*, 1993; Cintas *et al.*, 1993; Moreira, 1993; Sobrino, 1993; Cintas, 1995; Hugas *et al.*, 1995; Aymerich, 1996; Cintas *et al.*, 1998a), *Lb. plantarum* (Garriga *et al.*, 1993b; Vignolo *et al.*, 1993; Atrih *et al.*, 1993) y *P. acidilactici* (Bhunja *et al.*, 1987; González y Kunka, 1987; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1993; Moreira, 1993; Schved *et al.*, 1993; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) a partir de embutidos crudos curados elaborados sin adición de cultivos iniciadores.

Por otra parte, el aislamiento de una cepa de *L. lactis* de embutidos crudos curados es de una extraordinaria importancia porque tradicionalmente se ha considerado que estos microorganismos se encuentran asociados a la leche y a los productos lácteos y vegetales (Hirsch y Grinstead, 1951; Hardie, 1986; Teuber *et al.*, 1992). Hasta la fecha solamente se han aislado dos cepas de *L. lactis*, *L. lactis* FS92 y *L. lactis* BB24, de productos cárnicos, concretamente de carne de cerdo fresca (Garver y Muriana, 1993) y de embutidos crudos curados (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a), respectivamente. La cepa *L. lactis* G18, al igual que la cepa productora de nisina *L. lactis* BB24 (Cintas, 1995) fermentó la sacarosa, lo que es de una gran importancia pues se ha

demostrado que los determinantes genéticos que codifican la producción de nisina y la capacidad de fermentar dicho azúcar se encuentran ligados genéticamente (sección II.4.8.1). Por otra parte, la incapacidad de las cepas *L. lactis* G18 y *L. lactis* BB24 de fermentar la lactosa puede ser el resultado de su adaptación evolutiva a los sustratos cárnicos, en los que este azúcar se encuentra únicamente en concentraciones residuales.

El aislamiento de cepas de *E. faecium* en este trabajo no resulta sorprendente si se tienen en cuenta los hábitats característicos de esta especie y la forma de elaboración de los embutidos crudos curados empleados. *E. faecium* forma parte de la flora habitual del tracto intestinal del hombre y de algunos animales como, por ejemplo, los cerdos y los pollos sanos, junto con *E. faecalis*, *E. avium* y *E. hirae*, entre otros (Devriese *et al.*, 1992; Devriese y Pot, 1995) (Tabla II.4; sección II.2.3.2). Por otra parte, aunque para la preparación de embutidos crudos comerciales se utilizan generalmente tripas artificiales, todos los embutidos (chorizos) empleados en este trabajo se prepararon artesanalmente embutiendo carne fresca de cerdo en tripas naturales, lo que posibilitaría el acceso de *E. faecium* a la masa cárnica. Asimismo, la tolerancia de las cepas aisladas de *E. faecium* a los bajos pHs y su capacidad de producir bacteriocinas les permitiría competir exitosamente con el resto de la microflora presente en las materias primas y establecerse en el producto final. El aislamiento de cepas bacteriocinogénicas de esta especie a partir de chorizos elaborados artesanalmente empleando tripas naturales ha sido descrito también por Cintas (1995). Por otra parte, muchos autores han aislado cepas bacteriocinogénicas de *E. faecium* de diversos tipos de embutidos crudos curados, como el salami y el salchichón (Genigeorgis *et al.*, 1976; Garriga *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994; Devriese *et al.*, 1995; Aymerich, 1996).

Las 12 bacterias lácticas seleccionadas presentan características importantes desde el punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario. Así, pues, todas ellas provocan un descenso del pH del medio de cultivo en el que se desarrollan, son ácido-tolerantes, crecen en presencia de un 6,5% de cloruro sódico (a excepción de *L. lactis* G18) y a 8-10°C, no producen diacetilo (a excepción de *Lb. sake*-atípico B18, *E. faecium* P13, *E. faecium* T136 y *E. faecium*-atípico G16), ni dióxido de carbono, ni ácido sulfhídrico (Tabla IV.5; sección IV.5). La incapacidad de *L. lactis* G18 de crecer en presencia de un 6,5% de cloruro sódico no representa, en principio, una desventaja tecnológica, ya que las concentraciones de sal empleadas generalmente en nuestro país en la elaboración de embutidos crudos curados oscilan entre un 2 y un 2,5%. Las cepas *Lb. sake*-atípico B18, *E. faecium* P13, *E. faecium* T136 y *E. faecium*-atípico G16 producen diacetilo a partir de la glucosa, lo cual es una característica deseable desde el punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario, ya que el diacetilo contribuye al desarrollo del aroma y sabor de diversos productos lácteos fermentados y posee actividad antimicrobiana (sección II.2.4.3); no obstante, el diacetilo puede originar olores lácteos que son rechazables en los embutidos crudos curados (Berdagué *et al.*, 1992). Por otra parte, es interesante resaltar que ninguna de las 5 cepas aisladas del género *Enterococcus* posee actividad hemolítica o ureásica, lo que es de una extraordinaria importancia para su posible aplicación como cultivo iniciador y protector en los alimentos. En este contexto, conviene destacar que *E. faecium* es una especie catalogada como cultivo iniciador por la *International Dairy Federation* (Anon, 1991) y que se ha propuesto como cultivo iniciador en el queso *Cheddar* (Battistotti *et al.*, 1977; Tamine, 1990), en el queso *Mozarella* (Parente *et*

al., 1989), en el queso *Tallegio* (Giraffa *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1995) y en los ensilados (Lindgren *et al.*, 1985).

V.1.4. Espectro de acción, inmunidad y actividad antimicrobiana cruzada de las 12 bacterias lácticas seleccionadas

Las 12 bacterias lácticas seleccionadas en este trabajo producen sustancias antimicrobianas con amplios espectros de acción, ya que inhiben el desarrollo de otras bacterias lácticas y de microorganismos alterantes y patógenos Gram-positivos como *Propionibacterium* sp., *Prop. acidipropionici*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*; no obstante, las bacterias lácticas de morfología cocoide presentaron, en términos generales, espectros de acción más amplios y potentes que los bacilos (Tabla IV.3; sección IV.3). Es interesante destacar que *L. lactis* G18 y *Lb. plantarum* AA24 mostraron los espectros de acción más amplios; sin embargo, su actividad anti-*Listeria* fue mucho más débil que la de las otras cepas evaluadas (a excepción de *Lb. sake*-atípico S124). El amplio espectro de acción de *L. lactis* G18 es comparable al de otras cepas productoras de nisina (Hurst, 1981; Harris *et al.*, 1992) y, en concreto, al de la cepa de origen cárnico *L. lactis* BB24 (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a). Es interesante destacar que esta sustancia antimicrobiana, al igual que la nisina producida por otras cepas (De Vos *et al.*, 1993), no resultó muy efectiva frente a *Ls. monocytogenes*. Por el contrario, la sustancia antimicrobiana de *L. lactis* G18 inhibió eficazmente el desarrollo de células vegetativas de *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum* y, por homología con la nisina A producida por otras cepas de *L. lactis* (Hurst, 1981; Harris *et al.*, 1992), es posible hipotetizar que inhibiría también la germinación de las esporas clostridiales. El amplio espectro de acción de *L. lactis* G18 contrasta con el de la mayoría de las cepas bacteriocinogénicas de *L. lactis* no productoras de nisina caracterizadas hasta la fecha, entre las que se incluyen la lactococcina A/diplococcina (Holo *et al.*, 1991; Davey, 1994), la lactococcina B (Van Belkum *et al.*, 1992), la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), la lactococcina M (Venema, 1995) y la lacticina 481/ lactococcina DR (Dufour *et al.*, 1991; Piard *et al.*, 1991). En lo que respecta a los pediococos aislados en este trabajo, las cepas *P. acidilactici* A172, *P. acidilactici* X13 y *P. acidilactici* P20 mostraron un espectro de acción similar e inhibieron a todos los microorganismos empleados como indicadores, a excepción de *Lb. casei* ATCC334, *Lc. cremoris* DB1275 y *L. cremoris* CNRZ117. Asimismo, es interesante destacar la potente inhibición que ejercieron frente a microorganismos patógenos como *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Ls. monocytogenes* y *St. aureus*. Un espectro de acción similar se ha observado para otras cepas productoras de pediocina PA-1/AcH (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Henderson *et al.*, 1992; Moreira, 1993; Cintas, 1995), que es la única bacteriocina caracterizada hasta el momento en el género *Pediococcus*. Por otra parte, *Lb. plantarum* AA24 también mostró un amplio espectro de acción, en el que se incluyen *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Ls. monocytogenes*, *St. aureus* y *Prop. acidipropionici*, lo cual es una característica poco generalizada en las especies del género *Lactobacillus* (Cintas, 1995), que suelen presentar espectros de acción reducidos (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Joerger y Klenhammer, 1986; Rammelsberg *et al.*, 1990) o intermedios (Tichaczek *et al.*, 1992; González *et al.*, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993). Finalmente, las 5 cepas de *E. faecium* aisladas se caracterizaron por ejercer una potente inhibición del desarrollo de microorganismos alterantes del

género *Propionibacterium* y patógenos diversos como *Ls. monocytogenes* y *St. aureus* pero, sin embargo, resultaron poco efectivas o ineficaces frente a *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*, a excepción de las cepas *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136.

Ninguna de las bacterias lácticas aisladas en este trabajo inhibió el desarrollo de las bacterias Gram-negativas empleadas como indicadores, lo cual es una característica común entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas caracterizadas hasta el momento (De Vuyst y Vandamme, 1994b). No obstante, es posible sensibilizar las bacterias Gram-negativas a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas combinando éstas con agentes quelantes, como el ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA), y/o surfactantes, como el Triton y el Tween; así como mediante choques osmóticos que debiliten la pared celular, lo cual ya se ha utilizado con éxito con la nisina y con la pediocina PA-1/AcH (Stevens *et al.*, 1991; Kalchayanand *et al.*, 1992).

Las 12 bacterias lácticas seleccionadas fueron inmunes a sus propias sustancias antimicrobianas exocelulares (Tabla IV.4; sección IV.4), lo que constituye, junto a la naturaleza proteica y la actividad inhibidora, una de las características comunes de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Jack *et al.*, 1995). Partiendo de la premisa de que las bacterias lácticas son inmunes a sus propias bacteriocinas, los resultados de la actividad antimicrobiana cruzada permiten sugerir la identidad o heterogeneidad de diversas sustancias antimicrobianas incluso antes de que estas se purifiquen a homogeneidad y se determine su secuencia aminoacídica. En este contexto, cuando una cepa resulta inhibida por la(s) sustancia(s) antimicrobiana(s) de otra, y viceversa, se puede especular que ambas producen bacteriocinas diferentes. Asimismo, cuando dos cepas no se inhiben entre sí se puede sugerir que ambas producen la(s) misma(s) bacteriocina(s) o que, por el contrario, producen bacteriocinas distintas pero que cada cepa es resistente a la bacteriocina heteróloga. Este tipo de experimentos ha sido empleado también por Cintas (1995), Morgan *et al.* (1995), Aymerich (1996) y Jiménez-Díaz (comunicación personal), entre otros. La inmunidad y la actividad antimicrobiana cruzada de las 12 cepas aisladas en este trabajo y de *P. acidilactici* 347, *L. lactis* BB24, *E. faecium* L50 y *Lb. sake* 148 (Tabla IV.4; sección IV.4), junto con su espectro de acción y su identificación taxonómica, permitió establecer grupos de homología entre las sustancias antimicrobianas exocelulares de las cepas aisladas y la pediocina PA-1, la nisina A, las enterocinas L50A y L50B y la lactocina S.

Las bacteriocinas producidas por *P. acidilactici* A172, P20 y X13, por *L. lactis* G18 y por *Lb. sake* B18 y S124 son posiblemente la pediocina PA-1/AcH, la nisina A y la lactocina S, respectivamente, y la bacteriocina producida por *Lb. plantarum* AA24 es distinta a la lactocina S. Aunque estas bacteriocinas no se han purificado a homogeneidad, experiencias genéticas realizadas paralelamente a este trabajo, empleando la técnica de PCR, han confirmado estas hipótesis (Rodríguez *et al.*, 1995a; 1995b; 1997a). A pesar de que *Lb. sake*-atípico B18 y S124 producen lactocina S, estas cepas muestran espectros de acción diferentes entre sí y más amplios que el de la primera cepa productora de lactocina S identificada (*Lb. sake* L45) (Mortvedt *et al.*, 1991), lo cual podría reflejar la existencia de mecanismos de regulación que permiten una mayor producción y/o liberación exocelular de esta bacteriocina y, por lo tanto, una mayor actividad antimicrobiana exocelular en las cepas aisladas en este trabajo.

Las bacteriocinas de *E. faecium*-atípico AA13 y *E. faecium* P13, por una parte, y las de *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136, por otra, son iguales entre sí y diferentes a la pediocina PA-1,

nisina A y enterocinas L50A y L50B. Asimismo, la bacteriocina de *E. faecium*-atípico AA13 y *E. faecium* P13 es distinta a las producidas por *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136. La caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 realizada en este trabajo ha permitido confirmar que estas cepas producen bacteriocinas nuevas: la enterocina P y la enterocina B, respectivamente; la cepa *E. faecium* T136 produce, además, la enterocina A, una bacteriocina descrita y caracterizada previamente (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

El aislamiento de cepas de *P. acidilactici* y *Lb. sake* productoras de pediocina PA-1 y lactocina S, respectivamente, a partir de embutidos crudos curados elaborados sin adición de cultivos iniciadores se ha descrito previamente en numerosas ocasiones (Mortvedt y Nes, 1990; Mortvedt *et al.*, 1991; Sobrino *et al.*, 1992; Sobrino, 1993; Moreira, 1993; Cintas, 1995; Aymerich, 1996; Cintas *et al.*, 1998a), lo que permite sugerir que estas bacteriocinas confieren ventajas adaptativas a las bacterias lácticas productoras. Asimismo, el aislamiento de cepas de *P. acidilactici* productoras de pediocina PA-1 a partir de embutidos comerciales es bastante frecuente debido a su empleo como cultivos iniciadores en la industria cárnica (Bhunia *et al.*, 1987; González y Kunka, 1987; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Daba *et al.*, 1994). El que en este trabajo se haya aislado la cepa *L. lactis* G18 productora de nisina A de un embutido procedente de Sevilla y que Cintas (1995) aislase la cepa *L. lactis* BB24 de uno procedente de Teruel sugiere que las cepas de *L. lactis* productoras de esta bacteriocina están más extendidas en los productos cárnicos de lo que se había considerado tradicionalmente. Por otra parte, algunos autores han caracterizado bacteriocinas producidas por cepas de *Lb. plantarum* aisladas de embutidos crudos curados, como, entre otras, la plantaricina SA6 de *Lb. plantarum* SA6 (Rekhif *et al.*, 1995) y la plantaricina D de *Lb. plantarum* CTC305 (Aymerich, 1996). En lo que respecta a las bacteriocinas del género *Enterococcus*, se han descrito un gran número (Tablas II.5 y II.6); no obstante, las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; 1998a; 1998b) y la enterocina A (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996), todas ellas de origen cárnico, son, hasta la fecha, las únicas enterocinas que han sido caracterizadas a nivel bioquímico y genético.

Las características microbiológicas y bioquímicas de las 12 bacterias lácticas seleccionadas, aisladas e identificadas taxonómicamente en este trabajo, junto a su actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria, las convierten en candidatos potenciales para ser empleadas como cultivos iniciadores y/o protectores en la elaboración de embutidos crudos curados u otros derivados cárnicos y, posiblemente, de otros alimentos. Aunque de forma general las bacterias lácticas están reconocidas internacionalmente desde hace mucho tiempo como microorganismos GRAS para el consumo humano e incluso beneficiosos para la salud de sus consumidores (Adams y Marteau, 1995; Stiles, 1996), antes de proponer la aplicación de estas cepas en los alimentos es necesario realizar su caracterización toxicológica exhaustiva, así como la de sus bacteriocinas. Asimismo, se tiene que evaluar la producción *in situ* de las bacteriocinas, las interacciones de estos microorganismos y sus bacteriocinas con otros componentes de los alimentos y el efecto de su empleo en las propiedades organolépticas e higiénico-sanitarias del producto final.

En base a los resultados expuestos anteriormente se seleccionaron las cepas *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 para proceder a la caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas,

ya que la enterocina P y la enterocina B no se han descrito previamente y poseen un interesante espectro de acción antimicrobiana. Asimismo, la caracterización de bacteriocinas del género *Enterococcus* es muy importante debido a que actualmente se dispone de muy poca información acerca de las mismas, a pesar de los numerosos trabajos en los que se hace referencia a la bacteriocinogenicidad de este género (Tablas II.5 y II.6; sección II.3.2.1).

V.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13 Y DE LA ENTEROCINA B DE *E. faecium* T136

V.2.1. Condiciones experimentales óptimas para el crecimiento de *E. faecium* P13 y para la producción de enterocina P

La composición del medio de cultivo (nutrientes, agentes tensoactivos de superficie) y las condiciones de incubación (tiempo, temperatura, pH, tensión de oxígeno) son factores importantes en lo que respecta al crecimiento de las bacterias lácticas y a la producción de sus bacteriocinas (De Vuyst y Vandamme, 1994b). No obstante, la relación existente entre la cinética de crecimiento, la producción de las bacteriocinas y el efecto que ejercen diversos factores ambientales y nutricionales en ambos parámetros no se conoce con exactitud; así, pues, pequeñas variaciones en las condiciones de incubación (ambientales y/o nutricionales) que aparentemente no afectan al crecimiento del microorganismo productor pueden ser responsables de la estimulación o represión de los mecanismos implicados en la regulación de la producción de las bacteriocinas a nivel genético o posttraduccional (Mortvedt-Abildgaard *et al.*, 1995).

V.2.1.1. Efecto de la composición del medio de cultivo

Los estudios sobre el efecto de los componentes de los medios de cultivo en la producción de bacteriocinas revelan que ésta es máxima en medios de cultivo complejos (Geis *et al.*, 1983; Biswas *et al.*, 1991; Parente y Hill, 1992a; Daba *et al.*, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994c; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; De Vuyst, 1995; De Vuyst *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996); no obstante, este tipo de medios contiene cantidades significativas de péptidos de tamaño molecular similar al de la mayoría de las bacteriocinas activas (3.000-6.000 Da), por lo que su empleo dificulta la posterior purificación a homogeneidad de estas sustancias (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Los medios de cultivo empleados para determinar el efecto de su composición en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P contenían una base mineral de composición química indefinida o semidefinida y un azúcar fermentable (glucosa) como fuente de energía, a excepción del agua de peptona. Las incubaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de aerobiosis a 32°C durante 16 horas. Los resultados de la Tabla IV.8 (sección IV.8.1) muestran que *E. faecium* P13 se desarrolla en todos los medios de cultivo ensayados (agua de peptona, medio sintético o semidefinido, con o sin suplementos específicos, y medios complejos) y que su actividad antimicrobiana se detecta en todos ellos, a excepción del agua de peptona y los medios complejos BHI y TSB.

El medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *E. faecium* P13 y para la producción de enterocina P fue el caldo MRS, lo cual no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que en su formulación se incluye glucosa (2%), peptona (1%), extracto de levadura (0,4%), extracto de

carne (0,8%), diversas sales minerales (sulfato magnésico 0,02%, sulfato de manganeso 0,005%, acetato sódico 0,5%, fosfato potásico 0,2% y citrato triamónico 0,2%) y Tween 80 (0,1%). El pH inicial del caldo MRS es de 6,2 y, una vez desarrollado *E. faecium* P13, el pH final alcanzado fue de 4,3. La idoneidad del caldo MRS como medio de cultivo para la producción de enterocinas por diversas especies del género *Enterococcus* ha sido descrita en varias ocasiones (Arihara *et al.*, 1993; Vlaemynck *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Franz *et al.*, 1996); no obstante, algunos autores han obtenido mejores rendimientos empleando caldo M17 y GM17 (Torri Tarelli *et al.*, 1994; Parente y Hill, 1992a).

Cuando *E. faecium* P13 creció en caldo BHI o en TSB la biomasa formada fue prácticamente la misma que en caldo MRS pero, sin embargo, el pH final alcanzado fue superior a 5,5 y no se detectó actividad antimicrobiana. Estos medios de cultivo presentan un contenido de glucosa inferior al 0,3%, un elevado contenido de hidrolizados proteicos (2,2 y 2%), un pH inicial elevado (7,4 y 7,0) y carecen de sulfato magnésico, sulfato de manganeso y de agentes tensoactivos de superficie (Tween 80 y monoleato de sorbitán). En el caso del agua de peptona, el desarrollo de *E. faecium* P13 representó el 13% del cuantificado en MRS, no se produjo descenso del pH y tampoco se detectó actividad antimicrobiana. La ausencia de actividad antimicrobiana al emplear caldo BHI, TSB o agua de peptona puede deberse a que: (i) el valor de pH inicial del medio de cultivo es demasiado alto e inhibe la síntesis de la bacteriocina, (ii) el elevado pH final de los cultivos interfiere en la excreción de la bacteriocina y/o provoca su adsorción a la superficie celular, (iii) la ausencia de agentes tensoactivos en el medio de cultivo disminuye la absorción de algún elemento esencial implicado en la síntesis y/o excreción de la bacteriocina y/o desfavorece la disociación de posibles agregados inactivos de la misma, (iv) el contenido de hidrolizados proteicos inhibe la síntesis y/o excreción de bacteriocina o la enmascara en el sobrenadante impidiendo que ejerza su acción antimicrobiana, (v) estos medios carecen de sales que aporten los cationes divalentes Mg^{+2} y Mn^{+2} y/o (vi) a que estos medios contienen poca glucosa (concentración inferior al 0,3%) o carecen de ella (agua de peptona). El efecto positivo de la presencia de Tween 80 en la producción de bacteriocinas se ha descrito para la pediocina PA-1, carnocina LA44A, mesentericina 5, curvaticina FS47 y enterocina 900 (Biswas *et al.*, 1991; Van Laack *et al.*, 1992; Daba *et al.*, 1993; Garver y Muriana, 1994; Franz *et al.*, 1996). Por el contrario, la actividad de la pediocina A no se detectaba cuando la concentración de Tween 80 en el medio de cultivo era superior a 0,01% (Piva y Headon, 1994) y la de la lactocina S se incrementaba cuando no se adicionaba esta sustancia al medio de cultivo (Mortvedt *et al.*, 1991). Moreira (1993) y Sobrino (1993) obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, observando que la actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 y de la lactocina S no se detecta en los cultivos de *P. acidilactici* 347 y *Lb. sake* 148, respectivamente, desarrollados en el caldo BHI. Por otra parte, Geis *et al.* (1983) y Daba *et al.* (1993) compararon la producción de las bacteriocinas de diversas cepas de *Lactococcus* spp. y de la mesentericina 5 de *Lc. mesenteroides* UL5 en diversos caldos de cultivo y observaron que el BHI no era un medio favorable para su producción.

Tras el desarrollo de *E. faecium* P13 en el medio APT, la tasa de crecimiento y el valor final del pH fueron similares a los obtenidos en el caldo MRS pero, sin embargo, la actividad antimicrobiana detectada fue un 50% menor. El pH inicial del medio APT es 6,7 y en su

formulación se incluye glucosa (1%), triptona en lugar de peptona como fuente de hidrolizados proteicos (1,25%), extracto de levadura (0,75%), diversas sales minerales (sulfato magnésico 0,08%, cloruro de manganeso 0,014%, cloruro sódico 0,5%, sulfato ferroso 0,004% y citrato amónico 0,5%), clorhidrato de tiamina (0,00001%) y monoleato de sorbitan (0,02%). Torri Tarelli *et al.* (1994) obtuvieron resultados similares, ya que observaron que la tasa de crecimiento de *E. faecium* 7C5 en caldo APT y M17 era similar pero la actividad antimicrobiana detectada en el caldo APT representaba únicamente un tercio de la cuantificada en el medio M17. La concentración de cloruro sódico (0,5%, al igual que en los medios BHI y TSB), el valor de pH inicial (6,7 frente a un valor de 6,2 en los medios MRS y MB) y/o la presencia de monoleato de sorbitan como agente tensoactivo en lugar de Tween 80 y en una concentración cinco veces menor que en los medios MRS y MB pueden ser las causas de la disminución de la actividad antimicrobiana.

Cuando *E. faecium* P13 se desarrolló en el medio semidefinido MB, la tasa de crecimiento fue inferior a la detectada en los 4 medios complejos, el valor de pH final de los cultivos fue similar al observado en los medios MRS y APT y la actividad antimicrobiana cuantificada fue superior a la del caldo APT. El pH inicial del medio base es 6,2, al igual que en el caldo MRS, y en su composición se incluye glucosa (1%), extracto de levadura (0,5%), sales minerales (sulfato magnésico 0,02%, sulfato de manganeso 0,005%, sulfato ferroso 0,001%, cloruro sódico 0,2% y citrato amónico 0,2%) y Tween 80 (0,1%). La ausencia de hidrolizados proteicos, de extracto de carne como fuente de factores de crecimiento y/o de clorhidrato de tiamina pueden ser los factores responsables del menor crecimiento de *E. faecium* P13. La presencia de un 0,1% de Tween 80 y de glucosa a una concentración superior al 0,3% pueden ser los elementos causantes del incremento detectado en la actividad antimicrobiana. Por otra parte, la suplementación (1,5%) del medio semidefinido MB con diversos hidrolizados de proteínas de origen cárnico (peptona y proteasa-peptona), lácteo (triptona y caseínas) y mixto (triptosa) permitió incrementar la tasa de crecimiento y la productividad de bacteriocina de *E. faecium* P13, alcanzándose los valores máximos en el caso de la suplementación con triptona y caseínas. Cintas (1995) también observó que el crecimiento de *E. faecium* L50 y la producción de enterocinas L50A y L50B se incrementaba tras la suplementación del medio base con proteínas de origen lácteo. Por el contrario, Parente y Hill (1992a) observaron que la adición de diversas concentraciones de triptona hasta un 1,2% no modificaba la producción de enterocina 1146 de *E. faecium* DPC1146 y Sobrino (1993) comprobó que la suplementación del medio MB con hidrolizados proteicos lácteos no permitía detectar la actividad antimicrobiana exocelular (lactocina S) de *Lb. sake* 148.

De los resultados obtenidos tras el desarrollo de *E. faecium* P13 en diversos medios de cultivo se puede deducir que la producción de enterocina P requiere, al menos, la presencia de un hidrato de carbono fermentable (glucosa) a concentraciones superiores al 0,3%, de un agente tensoactivo (0,1% de Tween 80 ó 0,02% de monoleato de sorbitán) y de cationes divalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2}), así como que el pH inicial del medio de cultivo oscile entre 6,2 y 6,7 y que el pH final sea 4,4 ó inferior. Resultados similares a los de este trabajo fueron obtenidos por Biswas *et al.* (1991), quienes observaron que la glucosa (1%) era la fuente de carbono más apropiada para la producción de pediocina PA-1/AcH por *P. acidilactici* H y que la actividad antimicrobiana

detectada era máxima en presencia de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Tween 80 (0,2%) y cuando los valores iniciales de pH oscilan entre 6,0 y 6,5. Por otra parte, Franz *et al.* (1996) observaron que la adición de diferentes concentraciones de peptona, extracto de levadura y Tween 80 (0,1%) estimulaba la producción de enterocina 900 de *E. faecium* BFE900 y que el extracto de carne no influía en su actividad antimicrobiana. Parente y Hill (1992a) observaron que la producción máxima de enterocina 1146 de *E. faecium* DPC1146 se obtenía cuando el medio de cultivo contenía extracto de levadura (0,5%), Tween 80 (concentración inferior al 0,2%) y valores iniciales de pH entre 6,5 y 6,75.

V.2.1.2. Efecto de la tensión de oxígeno y de la temperatura de incubación

E. faecium P13 se desarrolla y produce actividad antimicrobiana tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis estricta, sin detectarse diferencias significativas en estos parámetros entre las dos atmósferas de incubación ensayadas. Asimismo, la producción de plantaricina C por *Lb. plantarum* LL441 y de las enterocinas L50A y L50B por *E. faecium* L50 tampoco parece estar influida por la presencia/ausencia de oxígeno (González *et al.*, 1994; Cintas, 1995). De Vuyst *et al.* (1996) estudiaron la influencia de diversas concentraciones de oxígeno en el crecimiento de *Lb. amylovorus* DCE471 y en la producción de amilovorina L471 y no detectaron diferencias tras su incubación en anaerobiosis o en atmósferas con un 40% de oxígeno; sin embargo, cuando los niveles de oxígeno aumentaron al 80% se incrementó considerablemente la producción de amilovorina L471. Por el contrario, Joerger y Klaenhammer (1986) y Mortvedt-Abildgaard *et al.* (1995) observaron que la producción de helveticina J y lactocina S era máxima cuando *Lb. helveticus* 481 y *Lb. sake* L45, respectivamente, se desarrollaban en una atmósfera de anaerobiosis.

Por otra parte, *E. faecium* P13 se desarrolla a 4, 8, 16, 24, 32, 37 y 45°C y su actividad antimicrobiana se detecta a todas estas temperaturas, excepto a 4 y 8°C (Figura 4.2; sección IV.8.3). La producción de la actividad antimicrobiana tiene lugar durante la fase exponencial del desarrollo bacteriano y comienza a detectarse una vez que el pH (pH inicial 6,2) ha descendido a 5,7 ó a valores inferiores, alcanzándose los valores máximos hacia el final de dicha fase (a 16, 24, 32 y 37°C) o al principio de la fase estacionaria (a 45°C). La actividad antimicrobiana se mantiene estable durante las 72 horas de incubación a 16°C; no obstante, a las restantes temperaturas, tras alcanzarse los valores máximos de actividad antimicrobiana tiene lugar una disminución gradual de la misma que es más acentuada conforme aumenta la temperatura de incubación. Los valores máximos de crecimiento de *E. faecium* P13 se obtienen a 37°C pero, sin embargo, la máxima actividad antimicrobiana se detecta tras su crecimiento a 32°C. De Vuyst *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares, ya que observaron que la producción de amilovorina L471 por *Lb. amylovorus* DCE471 era mayor a 30°C que a la temperatura óptima para su crecimiento (37°C); asimismo, estos autores observaron que condiciones de incubación desfavorables o estresantes que provocan cinéticas de crecimiento más lentas que la óptima (ej. bajas temperaturas, presencia de etanol, cloruro sódico, oxígeno, altas concentraciones de glucosa o microflora competitiva) estimulaban la producción de amilovorina L471. Desde un punto de vista de la ecología microbiana es posible sugerir que los niveles de ácido láctico producidos bajo estas condiciones no son suficientes para que las bacterias lácticas compitan

exitosamente con otros microorganismos, por lo que para compensarlo responden aumentando la producción de bacteriocinas (Parente *et al.*, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996).

La producción de la mayoría de las bacteriocinas, al igual que sucede en el caso de la enterocina P, es una característica asociada al crecimiento bacteriano, lo que permite considerarlas como metabolitos primarios (De Vuyst y Vandamme, 1994b). La consideración de las bacteriocinas como metabolitos primarios resulta reforzada por el hecho de que (i) las bacterias lácticas requieren elevados niveles de ATP para la biosíntesis de las bacteriocinas (De Vuyst y Vandamme, 1993; De Vuyst *et al.*, 1996) y (ii) la inducción de su síntesis no tiene lugar durante la fase estacionaria de crecimiento (Saucier *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1997). Biswas *et al.* (1991) han observado que la síntesis de pediocina PA1/AcH por *P. acidilactici* H se inicia en la fase exponencial y, a diferencia de lo descrito para otras bacteriocinas, continúa durante fase estacionaria del desarrollo celular. La producción de bacteriocinas en las primeras fases del crecimiento microbiano confiere una ventaja adaptativa a las bacterias lácticas productoras, lo que, junto a la acidificación progresiva del medio de cultivo, les permite convertirse en la flora predominante de una población mixta con microorganismos sensibles (Ahn y Stiles, 1990b). Desde un punto de vista fisiológico, la inactivación de las bacteriocinas en la fase estacionaria se compensaría por la producción constante de ácido láctico, que posee características de metabolito primario y secundario y una marcada actividad antimicrobiana (De Vuyst *et al.*, 1996).

La pérdida de actividad antimicrobiana detectada en este trabajo una vez alcanzados los valores máximos se ha observado también durante la cinética de producción de numerosas bacteriocinas del género *Enterococcus*, entre ellas las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995), enterocina 900 (Franz *et al.*, 1996), enterocina 1146 (Parente y Hill, 1992b; Parente y Ricciardi, 1994), enterocina 226NWC (Villani *et al.*, 1993) y la bacteriocina producida por *E. faecium* 7C5 (Torri Tarelli *et al.*, 1994); así como de otros géneros de bacterias lácticas, como la nisina A (De Vuyst y Vandamme, 1992), lactocina S (Mortvedt-Abildgaard *et al.*, 1995), sakacina A (Holck *et al.*, 1992), helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), lactococcina 140 (Parente *et al.*, 1994) y amilovorina L471 (De Vuyst *et al.*, 1996). Esta disminución de la actividad antimicrobiana podría deberse a una degradación de las bacteriocinas por la acción de proteasas exocelulares, a su conversión en otros metabolitos, a su adsorción a las células productoras y/o a la formación de agregados con otros componentes del medio.

El crecimiento y la producción de bacteriocinas a temperaturas de refrigeración se ha descrito en algunas especies de los géneros *Enterococcus* (Ben Embarek *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995), *Pediococcus* (Moreira, 1993) y *Lactobacillus* (Larsen *et al.*, 1993). Sin embargo, *E. faecium* P13 se desarrolló muy lentamente a 4°C y no se detectó actividad antimicrobiana en el medio exocelular. Tras 20 días de incubación a esta temperatura sólo se alcanzó el 0,05% de la población máxima obtenida a 37°C y el pH del medio de cultivo no descendió significativamente (valor final 6,0). Cintas *et al.* (1996) sugirieron que la falta de producción de enterocinas L50A y L50B cuando *E. faecium* L50 se desarrollaba a 4°C podría deberse a los bajos niveles de biomasa formada. Asimismo, el crecimiento de *E. faecium* P13 a 8°C fue lento y tras 20 días de incubación se alcanzó únicamente el 19% de la población bacteriana máxima obtenida a 37°C. A 8°C, el pH final del cultivo descendió a 5,0 pero la acidificación se produjo muy lentamente y, a diferencia de lo que sucedió a las temperaturas en

las que se detectó actividad antimicrobiana, el descenso significativo del pH no se produjo durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano, sino una vez que el cultivo había entrado en fase estacionaria. Este resultado sugiere la posibilidad de que la producción de enterocina P esté regulada por el pH, siendo necesario que su disminución (a valores inferiores a 5,7) ocurra durante la fase exponencial para que se induzca la síntesis, excreción y/o liberación al medio exocelular de enterocina P activa.

La capacidad de *E. faecium* P13 de desarrollarse y producir niveles similares de enterocina P en aerobiosis y anaerobiosis, así como en presencia de hidrolizados proteicos de origen cárnico y lácteo, permite sugerir su empleo como cultivo iniciador y protector tanto en productos cárnicos y lácteos conservados en atmósferas de oxígeno como en los envasados a vacío o en atmósferas modificadas o controladas.

V.2.2. Estabilidad físico-química y modo de acción de la enterocina P de *E. faecium* P13 parcialmente purificada

La actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 se abolió por completo tras someter sus sobrenadantes libres de células a la acción de enzimas proteolíticos inespecíficos (proteasa VI, proteasa XIV y papaína) y específicos (tripsina y pepsina) pero, por el contrario, resistió la acción de los enzimas lipolíticos (lipasa I y lipasa VII) y glucolíticos (α -amilasa) (sección IV.9.1.1). De estos resultados se deduce que la actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 se debe a la producción y liberación al medio exocelular de un componente de naturaleza proteica cuya actividad biológica no está mediada por componentes lipídicos ni hidrocarbonados. La inactivación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticos es una característica generalizada, si bien el patrón de sensibilidad a las diferentes proteasas es variable; así, por ejemplo, la actividad biológica de la enterocina 01 es abolida tras el tratamiento de los sobrenadantes de *E. faecium* NA01 con proteasa K pero no con tripsina y pepsina (Olasupo *et al.*, 1994); la actividad antimicrobiana de la enterocina A de *E. faecium* CTC492 desaparece con tripsina y proteinasa K y resiste la acción de la pepsina (Aymerich, 1996); la actividad biológica de la enterocina 1146 de *E. faecium* DPC1146, de las bacteriocinas de *E. faecium* JBL1061, JBL1083 y JBL1531 y de la enterocina 900 de *E. faecium* BFE900 se elimina tras someter los correspondientes sobrenadantes a la acción de la tripsina, proteinasa K y pepsina (Parente y Hill, 1992b; Arihara *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1996) y, por último, las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 se inactivan por tratamientos con tripsina, pepsina, papaína y proteasas II, VI y XIV (Cintas, 1995). En la bibliografía se han descrito bacteriocinas sensibles, además, a la acción de enzimas glucolíticos (leucocina S y lactocina 27), lipolíticos (lactacina F y mesentericina 52), o de ambos (fermenticina y plantaricina S), sugiriendo que su actividad biológica estaba mediada por compuestos glucoproteicos, lipoproteicos o glucolipoproteicos (De Klerk y Smith, 1967; Muriana y Klaenhammer, 1991a; Lewus *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 1993; Sudirman *et al.*, 1994; Upreti, 1994). No obstante, en la mayoría de estos casos, una vez realizada la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas se ha evidenciado que su estructura y actividad biológica es debida únicamente a una fracción de naturaleza proteica (Muriana y Klaenhammer, 1991b; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995).

La inactivación de la enterocina P por los enzimas proteolíticos, fundamentalmente por los de

origen pancreático (tripsina) y gástrico (pepsina), permite sugerir que la inclusión de esta bacteriocina como bioconservante en los alimentos no supondría, al menos potencialmente, riesgo sanitario alguno para los consumidores ya que sería degradada en el tracto gastrointestinal.

La actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 es estable en un amplio rango de pHs (2-11), tanto a 25 como a 4°C, si bien, la máxima estabilidad se detectó a valores de pH de 4 y 4,7 (Figura 4.3; sección IV.9.1.2). A bajos pHs (2-4,7) la temperatura de almacenamiento no afecta significativamente a su estabilidad; sin embargo, a medida que aumenta el pH, la estabilidad de la actividad antimicrobiana es ligeramente superior a la temperatura de refrigeración. Entre las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas del género *Enterococcus* solamente la enterocina 900 (Franz *et al.*, 1996), las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995) y las bacteriocinas producidas por *E. faecium* JBL1061, JBL1083 y JBL1531 (Arihara *et al.*, 1993) son estables en un rango de pHs tan amplio (Tablas II.5 y II.6). El resto de las enterocinas, al igual que la mayoría de las bacteriocinas producidas por los otros géneros de bacterias lácticas, se caracterizan por ser estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad (Hernández *et al.*, 1993; Cintas, 1995). La estabilidad de la enterocina P en tan amplio rango de pHs tiene una gran importancia desde el punto de vista tecnológico, ya que permitiría su empleo tanto en alimentos ácidos, como en los enlatados o derivados lácteos. Esta propiedad la diferencia de otras bacteriocinas como la nisina, cuya solubilidad y actividad antimicrobiana es máxima a pH 2,0, disminuye al aumentar el pH y desaparece reversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981).

La actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 es muy estable a los tratamientos térmicos a elevadas temperaturas (ej. 60 min a 100°C y 15 min a 121°C), lo cual es una característica común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, exceptuando las de elevado tamaño molecular como, entre otras, la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986) y la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990). Por otra parte, la termoestabilidad de la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 es pH-dependiente, siendo mayor a valores de pH ácidos (pH 4,5) (Figura 4.4; sección IV.9.1.3). Esta característica no es sorprendente ya que se ha descrito también para otras bacteriocinas del género *Enterococcus* (Tablas II.5 y II.6), para la mesentericina Y105 producida por *Lc. mesenteroides* Y105 (Hécharde *et al.*, 1992) y para la pediocina SJ1 producida por *P. acidilactici* SJ1 (Schvedt *et al.*, 1993). La gran termoestabilidad de la enterocina P sugiere que se trata de una molécula proteica sencilla, probablemente sin estructura terciaria compleja, y que permanecería biológicamente activa tras los tratamientos de pasteurización y esterilización a los que se someten habitualmente los alimentos.

La actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* P13 resiste la liofilización y la congelación-descongelación y, además, permanece estable después de 12 meses de almacenamiento a -20°C y tras 3 meses a 4, 8 y 25°C. Asimismo, al igual que con los tratamientos anteriores, la estabilidad mostrada durante el almacenamiento fue mayor a pH 4,5 (Tabla IV.11; sección IV.9.1.4). La estabilidad de la actividad antimicrobiana de la enterocina P durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiental y a las temperaturas de refrigeración y congelación empleadas en el almacenamiento de los alimentos es otra característica tecnológica interesante para su posible aplicación como bioconservante en la industria alimentaria.

En lo que respecta al modo de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, la mayoría

de ellas actúan de forma bactericida frente a los microorganismos sensibles (Cintas, 1995; Jack *et al.*, 1995), aunque se han descrito algunas bacteriostáticas, como la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), la leucocina A-UAL187 (Hastings y Stiles, 1991) y la leucocina S (Lewus *et al.*, 1992). No obstante, el modo de acción es un parámetro difícil de determinar y, sobre todo, de estandarizar, ya que está muy influido por el grado de purificación y la dosis de bacteriocina empleada, la carga microbiana inicial y la fase del crecimiento del microorganismo indicador, el tampón o medio de cultivo utilizado y las condiciones y duración de la incubación. En las experiencias realizadas en este trabajo, el microorganismo indicador se desarrolló en el medio de cultivo y bajo las condiciones de incubación óptimas para su crecimiento. La enterocina P ejerce un modo de acción bactericida frente a *Ls. monocytogenes* ScottA, ya que la adición de alícuotas de sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13 a cultivos de *Ls. monocytogenes* ScottA origina un rápido y drástico descenso de la población bacteriana inicial (un 81% durante los primeros 45 minutos) (Figura 4.5; sección IV.9.2). Transcurrido este tiempo, la acción bactericida de la enterocina P continúa durante 4 h y depende de la concentración de bacteriocina empleada, ya que la adición de 0,5 ml del sobrenadante redujo la población bacteriana inicial en un 94,9%, mientras que la adición de 1 ml produjo una reducción del 97,9%. La tasa de resistencia espontánea a la enterocina P fue de 5×10^{-2} cuando se añadieron 0,5 ml de sobrenadante y se redujo en un 50% (hasta 2×10^{-2}) cuando se aumentó su dosis a 1 ml. Este efecto bactericida dependiente de la dosis de enterocina P sugiere que las tasas de resistencia podrían reducirse considerablemente empleando concentraciones superiores de bacteriocina. Por otra parte, es posible que no todas las células viables detectadas tras 4 h de incubación sean resistentes a la bacteriocina, sino que se desarrollen porque ésta se empleó a dosis inferiores a las requeridas para ejercer su efecto bactericida frente a la totalidad de la población de células sensibles.

V.2.3. Optimización de la producción de la enterocina B y de la enterocina A de *E. faecium* T136

El desarrollo de las bacterias lácticas en fermentadores permite un mayor control de las condiciones de crecimiento (ej. pH y tensión de oxígeno) por lo que muchos investigadores han utilizado esta estrategia con el objeto de prolongar la fase exponencial de crecimiento y, por consiguiente, incrementar la producción de bacteriocinas como, entre otras, la enterocina 1146 (Parente y Ricciardi, 1994), la lactocina S (Mortvedt *et al.*, 1995), la lactocina 481 (Piard *et al.*, 1990; Piard, 1994), la lactococcina 140 (Parente *et al.*, 1994), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994), la bavaricina MN (Kaiser y Montville, 1993), la pediocina AcH (Biswas *et al.*, 1991), la nisina A (Hurst, 1981), la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), la mesentericina 5 (pH 5,0) (Daba *et al.*, 1993) y las carnobacteriocinas BM1 y B2 (pH 6,2 y 6,0) (Quadri *et al.*, 1994).

El crecimiento de *E. faecium* T136 y la producción de enterocinas B y A se estudió realizando diversas fermentaciones en caldo MRS a una temperatura de incubación de 30°C, en condiciones de anaerobiosis y manteniendo el pH constante a valores de 6,2; 5,7 y 5,2 (Figura 4.20; sección IV.11.2). Para impedir que la falta de glucosa pudiera ser el factor limitante del

crecimiento y/o de la producción de las enterocinas, cuando el cultivo había consumido aproximadamente el 83% de la glucosa del medio se añadieron nuevamente 40 g de este hidrato de carbono.

La actividad antimicrobiana máxima de los sobrenadantes de *E. faecium* T136 se detectó cuando el pH del medio de cultivo se mantuvo constante a 5,7, cuantificándose valores de 3.858 UB/ml de enterocina B y 1.114 UB/ml de enterocina A (Figura 4.20 B); asimismo, a este pH la actividad antimicrobiana resultó ser muy estable detectándose al final de la incubación un 99 y un 77% de los valores anteriores, respectivamente. A pH 6,2 los valores máximos de actividad antimicrobiana cuantificados fueron similares a los obtenidos a pH 5,7 (3.604 UB/ml de enterocina B y 911 UB/ml de enterocina A), si bien, una vez alcanzados disminuyeron drásticamente, detectándose al final de la incubación únicamente un 18% de los mismos (Figura 4.20A). Cuando *E. faecium* T136 se desarrolló aeróbicamente sin controlar el pH del cultivo, la actividad antimicrobiana del sobrenadante debida a la enterocina B y a la enterocina A fue de tan solo 219 UB/ml y 62 UB/ml, respectivamente. La drástica disminución de la actividad antimicrobiana de los cultivos desarrollados a pH 6,2 puede ser debida a: (i) la degradación enzimática por proteasas específicas o inespecíficas, (ii) la adsorción de las bacteriocinas a las células productoras y/o (iii) la formación de agregados inactivos de la bacteriocina (Parente y Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996).

La producción de actividad antimicrobiana a pH 6,2 y 5,7 tiene lugar durante la fase exponencial del crecimiento de *E. faecium* T136, lo que pone de manifiesto que las enterocinas A y B se sintetizan como metabolitos primarios. No obstante, su cinética de producción es diferente, ya que los valores máximos de enterocina A se alcanzan hacia la mitad de la fase exponencial y los de enterocina B al final de la misma. Respecto al crecimiento de *E. faecium* T136, éste fue óptimo a pH 6,2 y pH 5,7, aunque a este último valor el desarrollo fue algo menor y su cinética más lenta. En la mayoría de los casos descritos en la literatura, al igual que sucede con las enterocinas A y B, el valor óptimo de pH para la producción de bacteriocinas es inferior al valor óptimo de pH para el crecimiento y para la producción de ácido láctico (Parente y Ricciardi, 1994; Parente *et al.*, 1994; Nilsen *et al.*, 1998). Parente y Ricciardi (1994) estudiaron la influencia del pH en la producción de la enterocina 1146 y en el crecimiento de *E. faecium* DPC1146 y obtuvieron resultados similares a los de este trabajo. La producción de enterocina 1146 fue máxima a pH 5,5 y estuvo asociada a la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Una vez alcanzado el valor máximo de actividad antimicrobiana al final de la fase exponencial se detectó una disminución progresiva de la misma. La producción de bacteriocina a pH 6,0 mostró una cinética similar, si bien la actividad antimicrobiana fue más inestable, y a pH 5,0 la actividad antimicrobiana detectada fue mucho menor. Piard *et al.* (1990) y Kaiser y Montville (1993) describieron que la producción de lacticina 481 por *L. lactis* CNRZ481 y bavaricina MN por *Lb. bavaricus* MN es máxima a pH constante de 5,5 y 6,0, respectivamente, y que una vez alcanzados los valores máximos de actividad antimicrobiana éstos se mantenían estables durante un largo periodo de incubación.

Por otra parte, cuando el pH del medio de cultivo se mantuvo constante a pH 5,2 no se detectó la actividad antimicrobiana exocelular de *E. faecium* T136 (Figura 4.20C; sección IV.11.2), lo que puede deberse a alguna de las causas anteriores (i-iii), (iv) a que las enterocinas

B y A no sean biológicamente activas a este pH o (v) a que estas bacteriocinas no se sintetizen y/o transporten al medio exocelular. En este contexto, la importancia del pH en el control de la expresión génica de diversos metabolitos y proteínas celulares durante las fermentaciones bacterianas es un hecho ampliamente documentado (para una revisión consultar Olson, 1993). Regassa y Betley (1992) observaron que el sistema de autoregulación de transducción de señal de *St. aureus* (sistema *agr*) está controlado por factores ambientales y nutricionales, concluyendo que valores de pH alcalinos y/o un exceso de glucosa reprimen la expresión de los genes *agr* y, por tanto, disminuyen los niveles de la síntesis de diversas exoproteínas. Así, pues, se puede hipotetizar que las enterocinas B y A no se sintetizan en los cultivos desarrollados a pH 5,2 ya que este pH actúa sobre el sistema de regulación de dos componentes, bien a nivel de la transcripción, reprimiendo la expresión de los genes del factor de inducción (FI), de la proteína-histidina quinasa (PHQ) y del regulador de respuesta (RR), o bien a nivel posttraduccional, modificando estas proteínas e impidiendo por tanto su función biológica (Figura 2.3; sección II.4.8). Otra posibilidad es que este pH no afecte a la regulación de la producción de las enterocinas B y A sino a su(s) transportador(es) ABC específico(s), impidiendo de este modo su procesamiento, translocación y liberación al medio exocelular.

El desarrollo de *E. faecium* T136 manteniendo el pH constante a 5,7 en un fermentador a 30°C permitió incrementar aproximadamente 18 veces la producción de enterocina B y de enterocina A, con respecto a los valores de actividad cuantificados cuando *E. faecium* T136 se desarrolló a 30°C durante 16 horas sin controlar el pH del cultivo. Asimismo, la fermentación a pH 6,2 también permitió un incremento considerable de la producción de enterocinas B y A (aproximadamente 15 veces); no obstante, a este pH las bacteriocinas son muy inestables y se degradan rápidamente por lo que sería necesario recuperarlas inmediatamente después de su detección empleando, por ejemplo, resinas aniónicas. El desarrollo de *Lb. sake* L45 y *L. lactis* 481 manteniendo el pH constante a 5,0 y 5,5, respectivamente, permitió incrementar la producción de lactocina S y lacticina 481 entre 8-10 y 4 veces, respectivamente, con respecto a la cuantificada sin control del pH (Piard *et al.*, 1990; Piard, 1994; Mortvedt *et al.*, 1995). Es interesante destacar que Jiménez-Díaz *et al.* (1993) observaron que la máxima producción de plantaricina S tiene lugar cuando *Lb. plantarum* LPCO10 se desarrolla en presencia de un 4% de NaCl en un fermentador sin regular el pH, mientras que la máxima producción de la segunda bactericina (plantaricina T) se detecta cuando el pH se mantiene constante a 5,0 y 6,0. Estudios realizados por otros autores han permitido elucidar el pH óptimo para la producción de bacteriocinas como, entre otras, la mesentericina 5 (pH 5,0) (Daba *et al.*, 1993), la helveticina J (pH 6,0) (Joerger y Klaenhammer, 1986) y la lacticina B (pH 6,0) (Barefoot y Klaenhammer, 1984), la lactococcina 140 (pH 5,5) (Parente *et al.*, 1994) y las carnobacteriocinas BM1 y B2 (pH 6,2 y 6,0) (Quadri *et al.*, 1994).

V.2.4. Purificación a homogeneidad de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136

La purificación a homogeneidad de las bacteriocinas es un requisito indispensable para su correcta caracterización bioquímica, ya que, además de confirmar su naturaleza proteica, permite determinar su tamaño molecular y su composición y secuencia aminoacídica. Debido a que las

bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias es difícil generalizar y establecer un protocolo de purificación universal, por lo que éste debe determinarse empíricamente para cada bacteriocina. No obstante, independientemente del protocolo empleado, es conveniente determinar previamente las condiciones experimentales óptimas para su producción (ej. medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de incubación y tensión de oxígeno) y de este modo iniciar el proceso de purificación con una elevada concentración de bacteriocina.

V.2.4.1. Purificación a homogeneidad de la enterocina P de *E. faecium* P13

La purificación de la enterocina P de *E. faecium* P13 se realizó empleando una modificación (Cintas *et al.*, 1995; 1998a) de la metodología desarrollada por Nissen-Meyer *et al.* (1992), que incluye (i) precipitación de las proteínas con sulfato amónico, (ii) cromatografía de filtración en geles, (iii) cromatografía de intercambio catiónico, (iv) cromatografía de interacción hidrofóbica y (v) cromatografía de fase reversa en un sistema de FPLC (sección III.10.3.2). Muriana y Klaenhammer (1991b) purificaron la lactacina F con un protocolo similar y observaron que en la fracción obtenida tras la precipitación de las proteínas con sulfato amónico aparecían tres fases: un precipitado, una película flotante y el sobrenadante. La película flotante contenía el 97% de la actividad antimicrobiana y en el precipitado se detectaba únicamente un 3%. Resultados similares fueron obtenidos por Mortvedt *et al.* (1991) durante la purificación a homogeneidad de la lactocina S de *Lb. sake* L45. Por otra parte, Van Laack *et al.* (1992) experimentaban grandes pérdidas de actividad antimicrobiana durante la purificación de la carnocina LA44A a causa de este fenómeno y lo subsanaron cuando eliminaron el Tween de la composición del medio de cultivo; no obstante, la ausencia de este agente tensoactivo disminuía considerablemente la producción de bacteriocina. Durante la purificación de la enterocina P, tras la precipitación con sulfato amónico se recogieron y mezclaron el precipitado y la película superficial, lo que permitió recuperar el 99% de la actividad antimicrobiana inicial (Tabla IV.12; sección IV.9.3). Posteriormente, para llevar a cabo con éxito la purificación de la enterocina P fue necesario introducir la técnica cromatográfica de filtración en geles para eliminar las sales, ya que de otro modo resultaba infructuosa la posterior cromatografía de intercambio catiónico. Este mismo hecho se ha descrito en la purificación de otras bacteriocinas como la lactocina S (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a), la plantaricina S (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995) y la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991a). La presencia de sales (ej. sulfato amónico) interfiere en el proceso de atracción electrostática a la matriz de intercambio catiónico, ya que sus cargas positivas compiten exitosamente por los ligandos aniónicos de la resina y desplazan a las bacteriocinas débilmente catiónicas, como sucede con la enterocina P (ver sección V.2.7). La elución de la enterocina P de la columna de intercambio catiónico se realizó empleando un tampón de elevada fuerza iónica (tampón NaCl 1M, pH 5,8), obteniéndose una recuperación del 61% de la actividad antimicrobiana inicial y un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 106 veces. Tras la cromatografía de interacción hidrofóbica se detectó un incremento considerable de la actividad antimicrobiana (recuperación del 90%), que también se ha observado durante la purificación de numerosas bacteriocinas, entre ellas, la sakacina P y curvacina A (Tichaczek *et al.*, 1992), la sakacina A (Holek *et al.*, 1992), las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1995) y la nisina A (Cintas *et al.*, 1998a). Los incrementos en la actividad antimicrobiana durante

el proceso de purificación, no sólo tras la cromatografía de interacción hidrofóbica, sino también después de la de fase reversa, sugieren la posibilidad de que los medios apolares favorezcan la actividad biológica de las bacteriocinas como consecuencia de un cambio conformacional en la molécula (Cintas *et al.*, 1988a). Muchos autores han obtenido incrementos durante otra(s) etapa(s) de la purificación, lo que puede deberse a la disociación de los agregados de elevado tamaño molecular de las bacteriocinas en monómeros más activos y/o a la eliminación de compuestos que enmascaran su actividad antimicrobiana, como, por ejemplo, inhibidores de la bacteriocina o moléculas que agregan con ellas y forman complejos macromoleculares inactivos (Tichaczek *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Jiménez *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998a). Finalizada la purificación de la enterocina P se obtuvo un único pico de absorbancia a 254 nm con actividad antimicrobiana (fracción 8; Figura 4.7; sección IV.9.3), que mostró un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 115.323 veces y una recuperación del 28% de la actividad antimicrobiana inicial. Este protocolo se ha empleado también con éxito para la purificación de sistemas de dos péptidos (plantaricina S) y lantibióticos (lactocina S). Jiménez-Díaz *et al.* (1995) purificaron la plantaricina S y obtuvieron un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 352.617 veces y una recuperación del 91,6% de la actividad antimicrobiana inicial. Por otra parte, Cintas *et al.* (1988a) purificaron la lactocina S de *Lb. sake* V18 y obtuvieron un incremento de la actividad antimicrobiana específica de 160.000 veces y una recuperación del 26% de la actividad antimicrobiana inicial.

El protocolo empleado para la purificación de la enterocina P permitió obtener suficiente bacteriocina purificada a homogeneidad para determinar su composición aminoacídica (Tabla IV.13; sección IV.9.4) y la secuencia, por degradación de Edman, de los 43 primeros residuos aminoacídicos de su molécula (Figura 4.8; sección IV.9.5).

V.2.4.2. Purificación a homogeneidad de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136

El primer protocolo empleado para la purificación de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136 fue similar al descrito por Nissen-Meyer *et al.* (1992), no siendo necesario en este caso realizar una cromatografía de filtración en geles como paso previo a la cromatografía de intercambio catiónico (sección III.10.3.3). Una metodología análoga ha sido empleada con éxito para la purificación de las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998a,b), así como de bacteriocinas del tipo pediocina, como la pediocina PA-1 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) y la bavaricina A (Larsen *et al.*, 1993); sistemas de dos péptidos, como la lactococcina G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992) y lantibióticos, como la nisina A (Cintas 1995; Cintas *et al.*, 1998b).

Finalizado el proceso de purificación se obtuvieron tres cromatogramas, cada uno de ellos con un pico mayoritario de absorbancia a 254 nm que correspondía a la fracción que mostraba actividad inhibidora frente a *E. faecium* P13 (Figuras 4.17, 4.18 y 4.19; sección IV.11.1). Estas fracciones (A1, A2 y A3) eluyeron cuando la concentración de 2-propanol alcanzó el 26, 27 y 40%, respectivamente, mostraron una actividad antimicrobiana específica 7.533, 11.567 y 1.384 veces superior a la del sobrenadante libre de células y representaron, respectivamente, una recuperación del 0,8; 2 y 0,4% de la actividad antimicrobiana original (Tabla IV.17; sección IV.11.1). Estos resultados permitieron hipotetizar que *E. faecium* T136 sintetiza tres

bacteriocinas diferentes o que, por el contrario, las tres fracciones obtenidas corresponden a una o dos bacteriocinas que sufren modificaciones enzimáticas o químicas y por ello eluyen bajo condiciones diferentes. Worobo *et al.* (1994) purificaron la sustancia antimicrobiana producida por *C. piscicola* LV17A mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en geles y cromatografía de fase reversa en un sistema de FPLC y, al final del proceso de purificación, obtuvieron un cromatograma con numerosos picos de absorbancia a 218 nm. Tres de estos picos de absorbancia correspondían a fracciones que mostraban actividad antimicrobiana (A1, A2 y A3) y presentaban un 0,2; 2,5 y 5,8% de la actividad antimicrobiana original, respectivamente. Las tres fracciones eluyen cuando la concentración del tampón de elución (70% de acetonitrilo en un 0,1% de ácido trifluoroacético) alcanzaba un 46, 55 y 57%, respectivamente. Posteriormente, la determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas y de su secuencia aminoacídica parcial mediante degradación de Edman, así como la comprobación de la existencia y la secuenciación de un único gen estructural asociado a su producción, localizado en el plásmido pCP49 de *C. piscicola* LV17A, evidenció que las tres fracciones correspondían a una única bacteriocina, denominada carnobacteriocina A, que posee 53 aa y un tamaño molecular de $5.050,8 \pm 0,3$ Da. La fracción A2 ($5.067 \pm 0,3$ Da) correspondía a una forma oxidada de la fracción A3 ($5.050 \pm 0,3$ Da) y la fracción A1 ($4.524,7 \pm 9,4$ Da) contenía una mezcla inseparable de las dos formas anteriores degradadas proteolíticamente en sus extremos C-terminales. Asimismo, Quadri *et al.* (1994) detectaron al final del proceso de purificación de las sustancias antimicrobianas de *C. piscicola* LV17B tres picos de absorbancia que eluían a diferentes concentraciones del tampón de elución y que correspondían a fracciones con actividad antimicrobiana (BM1, B1 y B2). Estos autores, empleando técnicas similares a las descritas anteriormente, concluyeron que *C. piscicola* LV17B produce las carnobacteriocinas BM1 y B2. La fracción BM1 contenía la carnobacteriocina BM1, la fracción B1 contenía esta misma sustancia con el residuo de metionina de la posición 41 oxidado y la fracción B2 contenía la carnobacteriocina B2.

Los resultados obtenidos en este trabajo tras la secuenciación aminoacídica por degradación de Edman de los 18-19 residuos aminoacídicos del extremo N-terminal de las muestras A1, A2 y A3, así como su comparación con la secuencia de las bacteriocinas descritas hasta el momento, revelaron que la fracción A1 contenía la enterocina A, una bacteriocina descrita previamente producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996); la fracción A3 contenía una nueva bacteriocina, la enterocina B, y la fracción A2 estaba constituida por una mezcla de ambas. La cantidad de proteína de esta última fracción (16,5 μ g) era menor que la cuantificada en las fracciones A1 y A3 (36 μ g y 19,8 μ g, respectivamente) pero, sin embargo, su actividad antimicrobiana fue mayor, lo que sugirió que la enterocina A y la enterocina B podrían actuar de forma sinérgica (ver sección V.2.5).

El segundo protocolo empleado para la purificación de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136, una vez optimizada su producción en un fermentador (sección IV.11.2), se basó en una modificación de la metodología descrita por Havarstein *et al.* (1994), que incluye (i) cromatografía de interacción hidrofóbica (Amberlite XAD-16), (ii) cromatografía de intercambio catiónico, (iii) cromatografía de interacción hidrofóbica (Octyl Sepharose CL4B) y (iv) cromatografía de fase reversa en un sistema de FPLC (sección III.10.4.2). La selección como

microorganismos indicadores de *P. pentosaceus* FBB61 (resistente a la enterocina B y sensible a la enterocina A) y *Lb. sake* 148 (resistente a la enterocina A y sensible a la enterocina B) permitió el seguimiento del proceso de purificación de cada bacteriocina y facilitó la separación e identificación de los picos de absorbancia correspondientes a cada una de ellas desde la primera cromatografía de fase reversa (sección IV.11.2.2). La interacción hidrofóbica empleando la resina Amberlite XAD-16 es una técnica más rápida que la precipitación de las proteínas con sulfato amónico y tiene la ventaja de que se elimina el empleo de elevadas concentraciones de sales que pueden interferir en etapas posteriores; no obstante, esta técnica presenta el inconveniente de que la elución se realiza con tampones de pH extremadamente bajo (isopropanol 70%, pH 2), lo que va en detrimento de la especificidad o selectividad de las atracciones electrostáticas de la posterior cromatografía de intercambio catiónico. En la última cromatografía de fase reversa, las enterocinas B y A se eluyeron con gradientes isocráticos del 28 y 24% de 2-propanol, respectivamente, con el objeto de lograr una mayor resolución en su separación (Figuras 4.21 y 4.22; sección IV.11.2.2). Mediante esta metodología se obtuvieron muestras de enterocina B y enterocina A purificadas a homogeneidad, que representaron una recuperación del 16 y del 5%, respectivamente, de la actividad antimicrobiana inicial (Tabla IV.18; sección IV.11.2.2). A partir de la primera muestra se determinó la composición aminoacídica de la enterocina B (Tabla IV.19; sección IV.11.3), la secuencia de los 41 primeros residuos aminoacídicos de su molécula (Figura 4.23; sección IV.11.4) y su tamaño molecular ($5.479 \pm 1,2$ Da) mediante espectrometría de masas (Figura 4.24; sección IV.11.5).

Los resultados obtenidos tras la purificación de la enterocina P de *E. faecium* P13 y las enterocinas B y A de *E. faecium* T136 demuestran que las técnicas aplicadas en este trabajo permiten obtener, a partir de medios de cultivo complejos, bacteriocinas purificadas a homogeneidad y en cantidades suficientes para determinar su composición y secuencia aminoacídica y su tamaño molecular.

V.2.5. Espectro de acción de la enterocina P, enterocina B y enterocina A frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria

La actividad antimicrobiana de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de las enterocinas B y A de *E. faecium* T136 permaneció estable durante y tras su proceso de purificación, lo que permitió determinar sus CIMs frente a diversos microorganismos de interés en la industria alimentaria. Es interesante destacar que el espectro de acción antimicrobiana de la enterocina P purificada a homogeneidad (Tabla IV.14; sección IV.9.7) fue similar al obtenido cuando se emplearon los sobrenadantes y sobrenadantes concentrados de *E. faecium* P13 (Tabla IV.7; sección IV.7), lo que sugiere que la actividad antimicrobiana detectada es debida a la presencia de una sola bacteriocina (enterocina P). No obstante, el microorganismo alterante *Cl. tyrobutyricum* NCD01754, así como *B. cereus* ATCC9139 y *St. aureus* FRI349, dos microorganismos patógenos asociados frecuentemente a intoxicaciones alimentarias (CDC, 1979; Frazier y Westhoff, 1985; Doyle, 1988), no resultaron inhibidos por los sobrenadantes de *E. faecium* P13 pero, sin embargo, fueron sensibles a la enterocina P purificada a homogeneidad. Este fenómeno puede deberse a las mayores concentraciones de bacteriocina empleadas en los ensayos en placas microtituladoras, a una mayor actividad biológica de la enterocina P purificada y/o a una mayor

sensibilidad de estas cepas cuando se desarrollan en medio líquido. Por el contrario, algunas bacterias lácticas (*Lb. bulgaricus* ATCC11842 y *Lb. helveticus* ATCC15009) resultaron inhibidas por los sobrenadantes concentrados pero no por la enterocina P purificada, lo que puede deberse a una acción combinada de la bacteriocina y otros componentes de los sobrenadantes que se retiran durante la purificación y/o al desarrollo de células resistentes en los ensayos en placas microtituladoras que impedirían la detección de la actividad antimicrobiana.

Por otra parte, el espectro de acción antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* T136 mostró algunas diferencias muy interesantes con respecto a la actividad por separado de las enterocinas A y B purificadas. Así, por ejemplo, *Cl. perfringens* CECT376 y *Cl. botulinum* CECT551, dos microorganismos patógenos que han de ser controlados en los alimentos debido a que producen intoxicaciones alimentarias (Smith y Palumbo, 1981; Frazier y Westhoff, 1985), fueron inhibidos cuando se emplearon los sobrenadantes de *E. faecium* T136 (Tabla IV.3; sección IV.3), pero no cuando se expusieron a cada una de las bacteriocinas purificadas (Tabla IV.20; sección IV.11.7). Asimismo, al comparar el espectro antimicrobiano de cada una de las bacteriocinas se observaron diferencias significativas en su actividad inhibidora intra e interespecífica. En este contexto, las concentraciones de enterocina A requeridas para inhibir en un 50% el desarrollo de la mayoría de los microorganismos alterantes y patógenos analizados fueron significativamente inferiores a los valores cuantificados para la enterocina B. Además, algunos microorganismos fueron sensibles a una sola de estas bacteriocinas, como es el caso de *Lb. sake* 148, inhibido únicamente por la enterocina B, y de *P. pentosaceus* FBB61, *P. pentosaceus* FBB63, *Lb. curvatus* NCFB2739 y *B. cereus* ATCC9139, sensibles solamente a la enterocina A. Todas estas observaciones demuestran que la enterocina B y la enterocina A poseen actividad antimicrobiana de forma independiente y, además, permiten hipotetizar que ejercen su actividad antimicrobiana mediante mecanismos de acción diferentes y que actúan sinérgicamente. Esta última hipótesis se ha confirmado posteriormente mediante experiencias realizadas al margen de este trabajo (Casaus *et al.*, 1998). En este estudio se observó que la enterocina B y la enterocina A ejercen, independientemente, un modo de acción bactericida frente al desarrollo de *E. faecalis* EF y *Lb. sake* NCDO2714. Cuando los ensayos se realizaron con una sola bacteriocina, la tasa de resistencia espontánea fue de 10^{-4} - 10^{-2} y, tras 24 h de incubación, las células resistentes se desarrollaron hasta niveles de 10^7 - 10^9 ufc/ml; sin embargo, cuando los cultivos se expusieron a la acción simultánea de las enterocinas A y B, las tasas de resistencia descendieron a 10^{-6} y las células resistentes no se desarrollaron durante las 24 h que se prolongó su incubación. Asimismo, en los experimentos realizados con las enterocinas A y B se observó que las células resistentes a una bacteriocina eran, por el contrario, sensibles a la acción bactericida de la otra, y viceversa. La capacidad de *E. faecium* T136 de producir dos bacteriocinas de amplio espectro de acción que pueden actuar además sinérgicamente es de una extraordinaria importancia desde el punto de vista de su posible aplicación como cultivo iniciador y protector en los alimentos, ya que permitiría reducir la problemática de la aparición de poblaciones resistentes espontáneas, que es un fenómeno común al emplear las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Rekhif *et al.*, 1984; Harris *et al.*, 1991; Noerlis y Ray, 1994) y que actualmente constituye una de las preocupaciones más importantes de las industrias alimentarias e

instituciones sanitarias. Asimismo, es posible hipotetizar que la capacidad de producir dos bacteriocinas con características físico-químicas y modos de acción diferentes confiere a *E. faecium* T136 ventajas adaptativas frente a la flora competitiva, lo que explicaría que también se haya descrito la producción de enterocinas A y B en *E. faecium* CECT492 (sección IV.12.7; Nilsen *et al.*, 1998) y en otras bacterias lácticas de origen alimentario (Cintas y Nes, comunicación personal).

Hasta hace unos años, el aislamiento de bacterias lácticas productoras de más de una bacteriocina constituía un hecho aislado; no obstante, actualmente se está observando que esta capacidad de las bacterias lácticas está mas generalizada de lo que se había considerado tradicionalmente (Nes *et al.*, 1996). Así, pues, se han descrito cepas multiproductoras de bacteriocinas en *L. lactis* y *L. cremoris* (Van-Belkum *et al.*, 1989; Holo *et al.*, 1991), *Cb. piscicola* (Ahn y Stiles, 1990a,b; Pilet *et al.*, 1995), *Lb. plantarum* (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Diep *et al.* 1996; Anderssen *et al.*, 1998), *Lc. mesenteroides* (Revol-Juvelles *et al.*, 1996) y *E. faecium* (Cintas *et al.*, 1998b; Nilsen *et al.*, 1998).

La enterocina P de *E. faecium* P13 y las enterocinas B y A de *E. faecium* T136 inhibieron el crecimiento de las 5 cepas analizadas de *Ls. monocytogenes*, un microorganismo patógeno recalcitrante que se asocia frecuentemente a brotes de toxiinfecciones alimentarias (Farber y Peterkin, 1991; Lepoutre *et al.*, 1992). Así, por ejemplo, en la década de los 80 se registraron varios brotes epidemiológicos de listeriosis en todo el mundo: 20 casos y 3 muertos en Boston (1979) asociados al consumo de vegetales, 49 casos y 14 muertos en Massachusetts (1983) por consumo de leche pasteurizada, 122 casos y 31 muertos en Canton de Vaud (Suiza) (1983-1987) por consumo de queso fresco, 29 casos y 9 muertos en Nueva Zelanda (1980), 41 casos y 17 muertos en las provincias marítimas de Canadá (1981) por consumo de pescado y marisco y más de 300 casos en Reino Unido (1987-1989) por consumo de paté (Farber y Peterkin, 1991). La extraordinaria capacidad de *Ls. monocytogenes* de resistir y/o desarrollarse en condiciones extremas (ej. temperaturas de refrigeración y hasta 44°C, pHs entre 4,3 y 9, concentraciones de NaCl de 10-20%, presencia de nitritos hasta 1.000 µg/ml, desecación y congelación), adversas para la mayoría de los otros microorganismos patógenos, hace posible su presencia en estos alimentos e incluso en los embutidos crudos curados (Farber y Peterkin, 1991). El cumplimiento del sistema de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) y de unas buenas prácticas de fabricación (BPF) (American Meat Institute, 1982) constituyen, junto con los tratamientos físicos y el empleo de aditivos químicos, la estrategia actual más eficaz, aunque no la panacea, para controlar la presencia de este patógeno en los alimentos (Baird-Parker y Mayes, 1991). Resultados experimentales (Gould, 1996; McMullen y Stiles, 1996; Muriana, 1996) sugieren que esta estrategia podría complementarse con el empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas, lo que permitiría, a su vez, reducir los niveles de aditivos utilizados y suavizar los tratamientos físicos de los alimentos. En este contexto, resulta muy interesante destacar que las concentraciones medias de enterocina P y de enterocina A requeridas para inhibir el crecimiento de *Ls. monocytogenes* en un 50% fueron de tan solo 50 ng/ml, aproximadamente, lo que representa un valor 4 veces inferior al obtenido para la enterocina B. La marcada actividad antimicrobiana frente a especies del género *Listeria*, en general, y *Ls. monocytogenes*, en particular, es una de las características representativas de las

bacteriocinas del tipo pediocina como la pediocina AcH/PA-1, producida por diversas cepas de *P. acidilactici* (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Henderson *et al.*, 1992; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Schved *et al.*, 1993; Cintas, 1995) y por *Lb. plantarum* WHE92 (Ennahar *et al.*, 1996); la enterocina A (Aymerich, 1996), producida por *Enterococcus faecium* CTC492; la leucocina A-UAL187 (Hasting y Stiles, 1991) y la mesentericina Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), producidas por *Leuconostoc* spp., y, por último, la sakacina A/curvacina A (Schillinger y Lücke, 1989; Tichaczek *et al.*, 1992; Holck *et al.*, 1992) y la sakacina P/sakacina 674/bavaricina A (Tichaczek *et al.*, 1992; Larsen y Nørrung, 1993; Holck *et al.*, 1994a), producidas por *Lactobacillus* spp. Por otra parte, conviene destacar que la enterocina P y la enterocina A no inhiben el desarrollo de las cepas de *L. lactis* de origen lácteo (*L. lactis* CNRZ148, *L. lactis* CNRZ150 y *L. cremoris* CNRZ117). En este contexto, recientemente se ha descrito la resistencia de los lactococos a otras bacteriocinas del tipo pediocina como la pediocina PA-1 (Cintas *et al.*, 1998a), la sakacina A, la sakacina P y la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996), por lo que se puede sugerir que este hecho constituye otra característica típica del grupo. La ineficacia de las bacteriocinas del tipo pediocina frente a los lactococos podría deberse a que éstos carecen de los receptores específicos; no obstante, esta hipótesis es poco probable ya que Chen *et al.* (1997) han demostrado que la actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 (la bacteriocina modelo del grupo) no requiere la presencia de un receptor proteico específico. Otra posibilidad es que la resistencia de los lactococos sea debida a características intrínsecas de su membrana citoplasmática (ej. fluidez y composición y tipo de los fosfolípidos). En este contexto, es interesante mencionar que *L. lactis* BB24 es la única de las 4 cepas de *L. lactis* analizadas que fue inhibida por la enterocina P purificada a homogeneidad, siendo además la única de origen cárnico, lo que permite considerar que su adaptación a estos sustratos ha modificado la composición de su membrana con el resultado de su mayor sensibilización a esta bacteriocina.

Desde un punto de vista aplicado es interesante que la enterocina P y las enterocinas A y B no inhiban a *M. varians*, ya que esta especie se emplea habitualmente como cultivo iniciador en la elaboración de embutidos crudos curados porque sus actividades enzimáticas influyen favorablemente en la calidad higiénica y en las características organolépticas de este tipo de productos (sección II.1.3.). Finalmente, el amplio espectro de acción de estas bacteriocinas frente a microorganismos alterantes y patógenos asociados frecuentemente a brotes de toxiinfecciones alimentarias, especialmente *Ls. monocytogenes*, así como las pequeñas concentraciones requeridas en la mayoría de los casos para su inhibición, las convierte en candidatos potenciales para ser empleados como bioconservantes en la industria alimentaria, en combinación con el seguimiento del sistema ARICPC y de las BPF y formando parte de un sistema de barreras múltiples.

V.2.6. Estudio comparativo de la secuencia aminoacídica de la enterocina P, enterocina B, enterocina A y otras bacteriocinas de la clase II

La comparación de las secuencias aminoacídicas parciales obtenidas mediante degradación de Edman de las enterocinas P, B y A purificadas a homogeneidad con las deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de sus correspondientes genes estructurales permitió la determinación de sus secuencias aminoacídicas completas (Figura 4.13; sección IV.10.4; Figura 4.28; sección

IV.12.3 y sección IV.12.6). La enterocina P y la enterocina B, producidas respectivamente por las cepas *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 aisladas de embutidos crudos curados en este trabajo, son dos nuevas bacteriocinas, mientras que la segunda enterocina producida por *E. faecium* T136 resultó ser idéntica a la enterocina A producida por *E. faecium* CECT492 de origen cárnico, caracterizada previamente a nivel bioquímico y genético por Aymerich *et al.* (1996).

La enterocina P, la enterocina A y la enterocina B carecen de aminoácidos modificados posttraduccionalmente, lo que las diferencia de los lantibióticos (Sahl *et al.*, 1995; Nes y Tagg, 1996) y permite su inclusión en la clase II de las bacteriocinas (sección II.3.3). La enterocina P de *E. faecium* P13 y la enterocina A de *E. faecium* T136 contienen en su extremo N-terminal la secuencia consenso YGNGV característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Nes *et al.*, 1996) (sección II.3.3), entre las que también se incluyen la pediocina PA-1/AcH (Bhunia *et al.*, 1987; 1988; Motlagh *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992; Nieto Lozano *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Cintas, 1995), la leucocina A-UAL187 (Hasting y Stiles, 1991), la mesentericina Y105 (Hécharde *et al.*, 1992), la sakacina A/curvacina A (Holck *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992; Axelsson *et al.*, 1993; Tichaczek *et al.*, 1993), la sakacina P/674/bavaricina A (Tichaczek *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1993; Holck *et al.*, 1994a; Tichaczek *et al.*, 1994), la acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995), la bavaricina MN (Kaiser y Montville, 1996), las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri *et al.*, 1994), las piscicocinas V1a y V1b, esta última idéntica a la carnobacteriocina BM1 (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996), la piscicolina 126 (Jack *et al.*, 1996), la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) y la enterocina CRL35 (Farías *et al.*, 1996).

La comparación de la secuencia aminoacídica de la enterocina P y la enterocina A con la de las bacteriocinas del tipo pediocina mejor caracterizadas hasta el momento se muestra en la Figura 5.1A. Las mayores homologías de la enterocina P de *E. faecium* P13, expresadas como porcentajes de residuos aminoacídicos idénticos, se obtuvieron con la sakacina A/curvacina A (80,5% de identidad) de *Lb. sake* Lb706 (Holck *et al.*, 1992) y *Lb. curvatus* LTH1174 (Tichaczek *et al.*, 1992) y con la carnobacteriocina BM1 (74,5% de identidad) de *Cb. piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1994). Las homologías obtenidas con las otras enterocinas del grupo, la enterocina A de *E. faecium* T136 y *E. faecium* CECT492 (Aymerich *et al.*, 1996) y la bacteriocina 31 de *E. faecalis* Y117 (Tomita *et al.*, 1996), fueron del 45,5 y 44,2%, respectivamente. Asimismo, la enterocina P también mostró una homología muy significativa con las restantes bacteriocinas del tipo pediocina: leucocina A-UAL187 (48,7%) de *Lc. gelidum* A-UAL187 (Hastings *et al.*, 1991); sakacina P/bavaricina A (41,9%) de *Lb. sake* LTH673 (Tichaczek *et al.*, 1992) y *Lb. bavaricus* MI401 (Larsen *et al.*, 1993); mesentericina Y105 (40,5%) de *Lc. mesenteroides* Y105 (Hécharde *et al.*, 1992); carnobacteriocina B2 (38,6%) de *Cb. piscicola* LV17 (Quadri *et al.*, 1994) y pediocina PA-1/AcH (36,4%) de *P. acidilactici* PAC-1.0 (Henderson *et al.*, 1992). Estas observaciones demuestran que no existe una correlación entre la homología en la estructura primaria de las bacteriocinas del tipo pediocina y las relaciones filogenéticas de las bacterias lácticas productoras. La homología entre estas bacteriocinas del tipo pediocina está más acentuada en sus extremos N-terminales (Figura 5.1A), como ya se había observado para otras bacteriocinas del grupo (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Quadri *et al.*, 1994; Aymerich *et al.*, 1996; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996). La mayoría de ellas presentan la secuencia consenso YGNGV entre las posiciones 3/5-7/9, si bien, en la enterocina A se encuentra

A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|---|----|
| Enterocina P | - | - | - | A | T | R | S | Y | G | N | G | V | Y | C | N | N | S | K | C | W | V | N | W | G | E | A | K | E | N | I | A | G | I | V | I | S | G | W | A | S | G | L | A | G | M | G | H | - | - | - | - | - | - | 44 | | | | | |
| Sakacina A | - | - | - | ~ | A | R | S | Y | G | N | G | V | Y | C | N | N | K | K | C | W | V | N | R | G | E | A | T | Q | S | I | I | G | G | I | V | I | S | G | W | A | S | G | L | A | G | M | - | - | - | - | - | - | 41 | | | | | | |
| Carnobacteriocina BM1 | - | - | - | ~ | A | I | S | Y | G | N | G | V | Y | C | N | K | E | K | C | W | V | N | K | A | E | N | K | Q | A | I | I | T | G | I | V | I | G | G | W | A | S | S | L | A | G | M | G | H | - | - | - | - | - | - | 43 | | | | |
| Leucocina A-UAL7 | - | - | - | ~ | K | Y | Y | G | N | G | V | H | C | T | K | S | G | C | S | V | N | W | G | E | A | - | - | - | - | - | F | S | A | G | I | V | I | G | R | L | A | N | G | G | A | G | F | W | K | - | - | - | - | - | - | 37 | | | |
| Enterocina A | T | T | H | S | G | K | Y | Y | G | N | G | V | Y | C | T | K | N | K | C | T | V | D | W | A | K | A | S | T | R | C | I | A | G | M | I | V | I | G | G | F | L | G | A | I | P | W | A | K | P | R | - | - | - | - | - | - | 47 | | |
| Bacteriocina 31 | - | - | - | ~ | A | T | Y | Y | G | N | G | L | Y | C | N | K | Q | K | C | W | V | D | W | N | K | A | S | R | E | I | I | G | N | I | A | A | N | W | A | T | G | G | N | A | G | W | N | K | - | - | - | - | - | - | 43 | | | | |
| Sakacina P | - | - | - | ~ | K | Y | Y | G | N | G | V | H | C | G | K | H | S | C | S | V | D | W | N | G | E | A | - | - | - | - | A | S | A | G | I | H | R | L | A | N | G | G | N | G | F | W | - | - | - | - | - | - | 37 | | | | | | |
| Mesentericina Y105 | - | - | - | ~ | K | Y | Y | G | N | G | V | H | C | T | K | S | G | C | S | V | N | W | G | E | A | - | - | - | - | A | S | A | G | I | H | R | L | A | N | G | G | N | G | F | W | - | - | - | - | - | - | 48 | | | | | | | |
| Carnobacteriocina B2 | - | - | - | ~ | V | N | Y | G | N | G | V | S | C | S | K | T | K | C | S | V | N | W | G | Q | A | F | Q | E | R | Y | T | A | G | I | N | S | F | V | S | G | V | A | S | G | A | G | S | I | G | R | R | P | - | - | - | - | - | - | 48 |
| Pediocina PA-1 | - | - | - | ~ | K | Y | Y | G | N | G | V | T | C | G | K | H | S | C | S | V | D | W | G | K | A | T | T | C | I | I | N | N | G | A | M | A | W | A | T | G | G | H | Q | G | N | H | K | C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 44 |

B

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|-------------------------------------------------|---|---|---|---|-------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---|---|----|
| Enterocina B | E | N | D | H | R | M | P | N | E | L | N | - | - | R | P | N | N | L | S | K | G | G | A | K | C | G | A | A | I | A | G | G | L | F | G | I | P | K | G | P | L | A | W | A | A | G | L | A | N | V | Y | S | K | C | N | - | 53 |
| Carnobacteriocina A | - | - | - | D | Q | M | S | D | G | V | N | Y | G | K | G | S | S | L | S | K | G | G | A | K | C | G | L | G | I | V | G | G | L | A | T | I | P | S | G | P | L | G | W | L | A | G | A | A | G | V | I | N | S | C | M | K | 53 |

Figura 5.1. Comparación de la secuencia aminoacídica de la enterocina P y la enterocina A con la de otras bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina (A) y de la enterocina B con la carnobacteriocina A (B).

Se ha subrayado la posible secuencia consenso común de las regiones C-terminales de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina y no del tipo pediocina (ver texto; sección V.2.6). A la derecha del extremo C-terminal de cada secuencia se indica el número de aminoácidos de la bacteriocina. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

ligeramente desplazada hacia la región C-terminal, entre las posiciones 8 y 12. Asimismo, se observa que otras posiciones de la molécula están también muy conservadas en este grupo, lo que permite ampliar la secuencia consenso a “x1 YGNGVx2Cx3K/Nx4x5Cx6V N/Dx7x8x9A”; donde x1 representa tirosina o residuos polares sin carga; x2, representa tirosina o residuos polares neutros o con carga positiva; x3 representa residuos polares neutros o glicina; x4 representa un residuo polar; x5 representa residuos polares con carga positiva, glicina o residuos polares neutros; x6 un residuo polar neutro o aromático (triptófano); x7 representa triptófano o un residuo polar con carga positiva; x8 representa glicina o residuos pequeños no aromáticos y sin carga y x9 representa residuos polares con carga o neutros. Esta ampliación de la secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina concuerda, en líneas generales, con la propuesta por Quadri *et al.* (1994) y Bhugaloo-Vial *et al.* (1996). No obstante, se observan algunas diferencias significativas debidas a que en nuestro alineamiento se incluyeron también la enterocina P, la enterocina A y la bacteriocina 31. Así, por ejemplo, estos autores consideran que las posiciones x8 y x9 han de estar ocupadas por glicina y por un residuo polar neutro o con carga positiva, respectivamente, mientras que nuestros resultados indican que en la posición x8 es suficiente con que el aminoácido sea pequeño, no aromático y sin carga, así como, que es posible encontrar cualquier residuo polar, tanto con carga positiva o negativa como neutro, en la posición x9.

En lo que respecta a la región C-terminal, marcadamente más hidrófoba que la N-terminal, las bacteriocinas del tipo pediocina muestran una mayor variabilidad; no obstante, se puede observar la presencia de algunas posiciones conservadas. Así, por ejemplo, considerando las posiciones a partir de la alanina en posición 20 de la secuencia consenso se observa que: (i) las posiciones 4, 9 y 13 están ocupadas por aminoácidos apolares alifáticos (isoleucina, leucina, valina o alanina); (ii) la posición 12 contiene residuos apolares aromáticos (triptófano o fenilalanina) o alifáticos (leucina) y (iii) la posición 15 posee, en la mayoría de los casos, un residuo de glicina (Figura 5.1A). Asimismo, la mayoría de las bacteriocinas del tipo pediocina analizadas en este trabajo presentan residuos cargados positivamente en el extremo de su región C-terminal.

La enterocina B de *E. faecium* T136 no contiene en su molécula la secuencia consenso característica del extremo N-terminal de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina y, asimismo, no muestra homología significativa en su estructura primaria con ninguna de las bacteriocinas descritas hasta la fecha, a excepción de la carnobacteriocina A/piscicolina 61 de *Cb. piscicola* LV17A (Worobo *et al.*, 1994) y *Cb. piscicola* LV61 (Holek *et al.*, 1994b), con la que comparte un 47% de residuos aminoacídicos idénticos. Este hecho constituye la primera evidencia de una homología tan significativa entre bacteriocinas de la clase II que no pertenecen al grupo del tipo pediocina. En la Figura 5.1B se compara la secuencia aminoacídica de la enterocina B con la de la carnobacteriocina A/piscicolina 61 y se observa que, a diferencia de lo descrito para las bacteriocinas del tipo pediocina, la homología entre ambas bacteriocinas es más pronunciada en su región C-terminal. En la porción central de esta región se observa la secuencia A/GWA/LAG (Figura 5.1B). Esta secuencia se identificó también en las regiones C-terminales de las bacteriocinas del tipo pediocina (Figura 5.1A), cuando se compararon sus secuencias aminoacídicas con la de la enterocina B y carnobacteriocina A/piscicolina 61 (resultados no

mostrados) (Casaus *et al.*, 1997). Esta observación, considerando además las conclusiones mencionadas anteriormente respecto a los residuos conservados en las regiones C-terminales de las bacteriocinas del tipo pediocina (ver párrafo anterior), permite sugerir la secuencia consenso G/x1WAx2G, común a todas ellas (excepto la leucocina A-UAL187 y la mesentericina Y105); donde x1 representa residuos polares neutros o alanina, W representa un residuo aromático (triptófano o, en dos casos, fenilalanina) y x2 representa residuos polares neutros o glicina. La leucocina A-UAL187 y la mesentericina Y105 son las únicas que presentan un residuo cargado en la posición x1 (arginina) y que no contienen un residuo aromático en la posición W. Es interesante destacar que la enterocina B y la pediocina PA-1 (identidad de únicamente el 18%) son las únicas que presentan un residuo apolar (alanina) en la posición x1 de esta secuencia consenso y que, sorprendentemente, ambas bacteriocinas muestran una identidad del 42% en los 16 últimos residuos de sus extremos C-terminales. Al igual que las bacteriocinas del tipo pediocina analizadas en este trabajo, la enterocina B y la carnobacteriocina A presentan residuos cargados positivamente en el extremo de su región C-terminal, lo que también se ha observado para otras bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina (ej. lactococcina A) y sistemas de dos péptidos (ej. lactococcina M y lactacina F), así como para bacteriocinas de la clase I o lantibióticos (nisina, lactocina S y lacticina 481) (Fremaux *et al.*, 1993).

V.2.7. Estudio comparativo de los parámetros físico-químicos de la enterocina P, enterocina B, enterocina A y otras bacteriocinas de la clase II

Los principales parámetros físico-químicos de la enterocina P, enterocina B, enterocina A y otras bacteriocinas caracterizadas de la clase II se muestran en las Tablas V.1 y V.2. El tamaño molecular teórico de la enterocina P es de 4.630 Da y el de las otras bacteriocinas del tipo pediocina oscila entre 3.870 Da (mesentericina Y105) y 5.009 Da (bacteriocina 31); asimismo, la mayoría de ellas contienen 41-44 aminoácidos, si bien, la leucocina A-UAL187 y la mesentericina Y105 contienen únicamente 37 residuos aminoacídicos y la enterocina A y la carnobacteriocina B2 presentan 47 y 48 aminoácidos, respectivamente (Tabla V.1). El tamaño molecular teórico de la enterocina B y la carnobacteriocina A es de 5.465 y 5.053 Da, respectivamente (Tabla V.2). La enterocina B y las bacteriocinas no del tipo pediocina analizadas en este trabajo presentan un tamaño molecular teórico y un número de aminoácidos superior en un 17 y un 22%, respectivamente, al de las bacteriocinas del tipo pediocina.

En lo que respecta a su composición aminoacídica, la enterocina P y la enterocina A presentan en su molécula al menos dos residuos del aminoácido azufrado cisteína (separados por cuatro aminoácidos), al igual que todas las bacteriocinas del tipo pediocina (Tabla V.4; sección V.3.3), lo que permite su denominación como cistibióticos (Jack *et al.*, 1995). La enterocina P, al igual que la mayoría de las bacteriocinas del grupo, presenta únicamente dos residuos de cisteína en su extremo N-terminal; por el contrario, la enterocina A y la pediocina PA-1/AcH presentan además otros dos residuos de este aminoácido en su extremo C-terminal, separados por una distancia de 17-19 aminoácidos. La enterocina B, la carnobacteriocina A y la divergicina A también presentan en su molécula dos residuos de cisteína por lo que se pueden considerar cistibióticos; sin embargo, a diferencia de lo observado en las bacteriocinas del tipo pediocina, uno de los residuos se encuentra en la mitad de la molécula y el otro en el extremo de la región C-

Tabla V.1. Parámetros físico-químicos de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de diversas bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina

| | Pm (Da) | Nº aa | % de aminoácidos | | | | | | Aminoácidos ausentes | Carga neta ^a | pI | Índice GRAVY | Nº PTHs |
|-----------------------|------------|----------|------------------|----------|----|---------|----|----|-------------------------|----------------------------|------|-----------------|------------|
| | | | Gly | apolares | | polares | | | | | | | |
| | | | | Af | Ar | Nt | Ac | Bs | | | | | |
| ENTEROCINA P | 4.630 | 44 | 18 | 30 | 11 | 27 | 5 | 9 | P, F, Q, D | 1 | 8,29 | -1,50 | 1 |
| SAKACINA A | 4.309 | 41 | 20 | 29 | 10 | 29 | 2 | 10 | P, F, H, D | 3 | 9,64 | -1,86 | 1 |
| CARNOBACTERIOCINA BM1 | 4.527 | 43 | 16 | 32 | 9 | 26 | 5 | 12 | P, F, R, D | 2 | 8,99 | -0,77 | 1 |
| LEUCOCINA A-UAL187 | 3.932 | 37 | 22 | 19 | 16 | 27 | 3 | 13 | I, P, M, Q, D | 2 | 8,87 | -3,92 | - |
| ENTEROCINA A | 4.833 | 47 | 19 | 25 | 11 | 30 | 2 | 13 | Q, E, R | 4 | 9,0 | -0,3 | 1 |
| BACTERIOCINA 31 | 5.009 | 43 | 12 | 28 | 16 | 23 | 5 | 16 | M, F | 4 | 9,85 | -6,91 | - |
| SAKACINA P | 4.437 | 43 | 21 | 23 | 12 | 30 | 2 | 12 | L, P, M, F, Q, E, R | 2 | 8,86 | -5,75 | - |
| MESENERICINA Y105 | 3.870 | 37 | 13 | 22 | 22 | 27 | 3 | 13 | P, M, Q, D | 2 | 8,87 | -4,11 | - |
| CARNOBACTERIOCINA B2 | 4.969 | 48 | 10 | 17 | 25 | 35 | 2 | 11 | L, M, D, H | 4 | 10,0 | -2,78 | - |
| PEDIOCINA PA-1 | 4.628 | 44 | 9 | 18 | 21 | 34 | 2 | 16 | L, P, F, E, R | 3 | 8,65 | -4,94 | - |

^aCarga neta a pH 7.0. Símbolos y abreviaturas: Nº aa, número de aminoácidos; Ar, residuos apolares aromáticos; Af, residuos apolares alifáticos; Sf, residuos apolares sulfurados; Nt, residuos polares neutros; Ac, residuos polares ácidos; Bs, residuos polares básicos; pI, punto isoeléctrico; Índice GRAVY, valor promedio hidropático; Nº PTH, número de posibles hélices α transmembrana. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

Tabla V.2. Parámetros físico-químicos de la enterocina B de *E. faecium* T136 y de diversas bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina

| | Pm (Da) | Nº aa | % de aminoácidos | | | | | | Aminoácidos ausentes | Carga neta ^a | pI | Índice GRAVY | Nº PTHs |
|---------------------|------------|----------|------------------|----------|----|---------|----|----|-------------------------|----------------------------|------|-----------------|------------|
| | | | Gly | apolares | | polares | | | | | | | |
| | | | | Af | Ar | Nt | Ac | Bs | | | | | |
| ENTEROCINA B | 5.465 | 53 | 15 | 39 | 6 | 21 | 6 | 13 | Q, T | 3 | 9,7 | -3,8 | 1 |
| CARNOBACTERIOCINA A | 5.053 | 53 | 25 | 37 | 4 | 22 | 4 | 8 | F, E, R, H | 2 | 9,02 | +2,58 | 1 |
| ACIDOCINA B | 5.754 | 59 | 11 | 55 | 8 | 15 | 6 | 5 | M, C, E | 0,07 | 7,38 | +9,59 | 1 |
| LACTOCOCCINA A | 5.778 | 54 | 15 | 30 | 15 | 29 | 2 | 9 | P, C, E, R | 1,26 | 9,21 | -2,54 | 1 |
| LACTOCOCCINA B | 5.328 | 47 | 11 | 23 | 17 | 30 | 6 | 13 | N | 2 | 9,25 | -4,45 | - |
| DIVERGICINA A | 4.224 | 46 | 31 | 41 | 2 | 19 | 0 | 7 | W, Y, S, E, D, R, H | 3 | 9,96 | +4,26 | 1 |

^aCarga neta a pH 7.0. Símbolos y abreviaturas: Nº aa, número de aminoácidos; Ar, residuos apolares aromáticos; Af, residuos apolares alifáticos; Sf, residuos apolares sulfurados; Nt, residuos polares neutros; Ac, residuos polares ácidos; Bs, residuos polares básicos; pI, punto isoelectrico; Índice GRAVY, valor promedio hidropático; Nº PTH, número de posibles hélices α transmembrana. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

terminal, separados por una distancia de 28-31 aminoácidos (Tabla V.4). Otras bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina presentan un solo residuo de cisteína en la mitad de su molécula (lactococcina B) o carecen de este aminoácido (lactococcina A y acidocina B). En lo que respecta a los sistemas de dos péptidos de la clase II, algunos presentan dos residuos de cisteína, como la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997) y la lactacina F (Allison *et al.*, 1994), y otros, como la lactococcina G y la lactococcina M, carecen de este aminoácido (Tabla V.4).

La enterocina P, la enterocina B y la enterocina A poseen, al igual que las demás bacteriocinas de las bacterias lácticas, un elevado porcentaje de residuos del aminoácido glicina (18, 19 y 15%, respectivamente) (Tablas V.1 y V.2). En términos generales, en las bacteriocinas de la clase II el 17% de la molécula corresponde a residuos de glicina, destacando la pediocina PA-1 y la divergicina A por presentar valores extremos (9 y 31%, respectivamente). Por otra parte, la enterocina P carece de residuos del aminoácido prolina y la enterocina A y la enterocina B presentan un 2 y un 7%, respectivamente. La mayoría de las bacteriocinas del tipo pediocina analizadas en este trabajo carecen de prolina o la presentan en porcentajes muy bajos (2-4,5%), mientras que las bacteriocinas no del tipo pediocina casi siempre presentan este aminoácido, en concentraciones entre el 2 y 7,5%. Es interesante destacar que todas las bacteriocinas analizadas en este trabajo contienen aminoácidos aromáticos, principalmente triptófano y, aunque en menor medida, tirosina.

Como se deduce de los datos de las Tablas V.1 y V.2, la enterocina A, la enterocina P y la enterocina B poseen un 36, 41 y 45% de aminoácidos apolares en su molécula, respectivamente. El porcentaje medio de residuos apolares en las bacteriocinas de la clase II analizadas en este trabajo es del 42%, siendo el valor inferior un 35%, en el caso de la leucocina A-UAL187, y el máximo un 63%, en el caso de la acidocina B. En lo que respecta a los aminoácidos polares, en términos generales se observa que los porcentajes observados en las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina son ligeramente superiores a los de las bacteriocinas no del tipo pediocina. Los aminoácidos polares más abundantes en ambos grupos son los residuos neutros y básicos (principalmente lisina), a excepción de la acidocina B, lo que les confiere carácter catiónico (carga neta a pH 7,0 entre 1 y 4). El elevado porcentaje de residuos apolares, la presencia de aminoácidos polares básicos y el elevado pI de las enterocinas P, B y A explica su comportamiento durante su purificación a homogeneidad empleando una metodología basada en los principios de las cromatografías de intercambio iónico e interacción hidrofóbica (sección III.2.10.3.1). El bajo carácter catiónico de la enterocina P (carga neta a pH 7,0 de 1), en comparación con el de las enterocinas B y A (carga neta a pH 7,0 de 3 y 4, respectivamente), explicaría, en parte, porqué fue necesario eliminar la competencia de las sales, mediante cromatografía de filtración en geles, como paso previo a la cromatografía de intercambio catiónico (sección IV.9.3).

A partir de la estructura primaria de la enterocina P, enterocina A, enterocina B y de las otras bacteriocinas de la clase II analizadas en este trabajo se determinaron informáticamente sus índices GRAVY de hidropaticidad (Kyte y Doolite, 1982), que pusieron de manifiesto su carácter hidrófobo (Tablas V.1 y V.2). En términos generales, las bacteriocinas no del tipo pediocina mostraron índices GRAVY superiores a los de las bacteriocinas del tipo pediocina. No obstante, la enterocina P y la enterocina A presentan valores de -1,5 y -0,3, respectivamente, los

cuales son significativamente superiores al de la enterocina B (-3,8) y a los de la práctica totalidad de las bacteriocinas del tipo pediocina (entre -1,86 y -6,91). El programa SOAP predijo, empleando el método de predicción topológica de Klein *et al.* (1985), que no se trata de proteínas de membrana integrales sino periféricas, a excepción de la acidocina B (índice GRAVY de +9,59). Mediante el modelo de predicción topológica descrito por Eisenberg *et al.* (1984) se predijo la existencia de posibles hélices α transmembrana (PTH), de al menos 20 residuos aminoacídicos, en las bacteriocinas del tipo pediocina enterocina P, enterocina A, sakacina A y carnobacteriocina BM1/piscicocina VIB, en la enterocina B y en otras bacteriocinas no del tipo pediocina, a excepción de la lactococcina B (Tablas V.1 y V.2). Los perfiles hidropáticos de la enterocina P, enterocina A y enterocina B ponen de manifiesto que sus regiones N-terminales son más hidrófilas que los extremos C-terminales, en los que se localizarían las posibles hélices α transmembrana (Figura 5. 2).

V.2.8. Relación entre la estructura peptídica de la enterocina P, enterocina B y enterocina A y su actividad biológica

La comparación de las secuencias aminoacídicas de diferentes péptidos o proteínas mediante procedimientos informáticos, junto con el desarrollo de modelos de predicción topológica a partir de su estructura primaria, permite conocer aspectos relacionados con su estructura secundaria y terciaria, con su función biológica y con sus relaciones evolutivas. En lo que respecta a las bacteriocinas de las bacterias lácticas es posible evidenciar, o al menos intuir, la relación estructura-función mediante la comparación de sus secuencias aminoacídicas y sus espectros de acción antimicrobiana, como lo demuestra el que todas las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina ejercen una marcada actividad antimicrobiana frente a las especies del género *Listeria* y contienen la secuencia consenso YGNGV en su extremo N-terminal y un número variable de residuos del aminoácido sulfurado cisteína (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Klaenhammer, 1993; Quadri *et al.*, 1994; Aymerich *et al.*, 1996; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996) (Tabla V.4; sección V.3.3). No obstante, se han descrito y caracterizado bacteriocinas que aunque no muestran homologías estructurales con este grupo poseen actividad anti-*Listeria*, como es el caso, entre otras, de las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998a; 1998b), bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina como la curvaticina FS47 de *Lb. curvatus* FS47 (Garver y Muriana, 1994) y lantibióticos como la nisina (Hurst, 1981; Cintas *et al.*, 1998a).

El tamaño molecular teórico de la enterocina B deducido a partir de la secuencia nucleotídica de su gen estructural es de 5.465 Da (sección IV.12.3), mientras que el valor obtenido por espectrometría de masas es de $5.479,0 \pm 1,2$ Da (Figura 4.24; sección IV.11.5). La diferencia entre ambos valores es de $14 \pm 1,2$, lo que sugiere, teniendo en cuenta su secuencia aminoacídica (Figura 5.1B), la posibilidad de que el átomo de azufre del único residuo de metionina de la molécula (Met6) se encuentre oxidado a sulfóxido y que se establezca un puente disulfuro entre las cisteínas de las posiciones 23 y 52. Otras bacteriocinas en las que se ha detectado la oxidación de los residuos de metionina son la carnobacteriocina BM1 (Quadri *et al.*, 1994), la pediocina PA-1 y la curvacina A (Fimland *et al.*, 1997). Fimland *et al.* (1997) observaron que la oxidación de estas bacteriocinas, así como de los correspondientes péptidos sintéticos, tiene lugar de forma

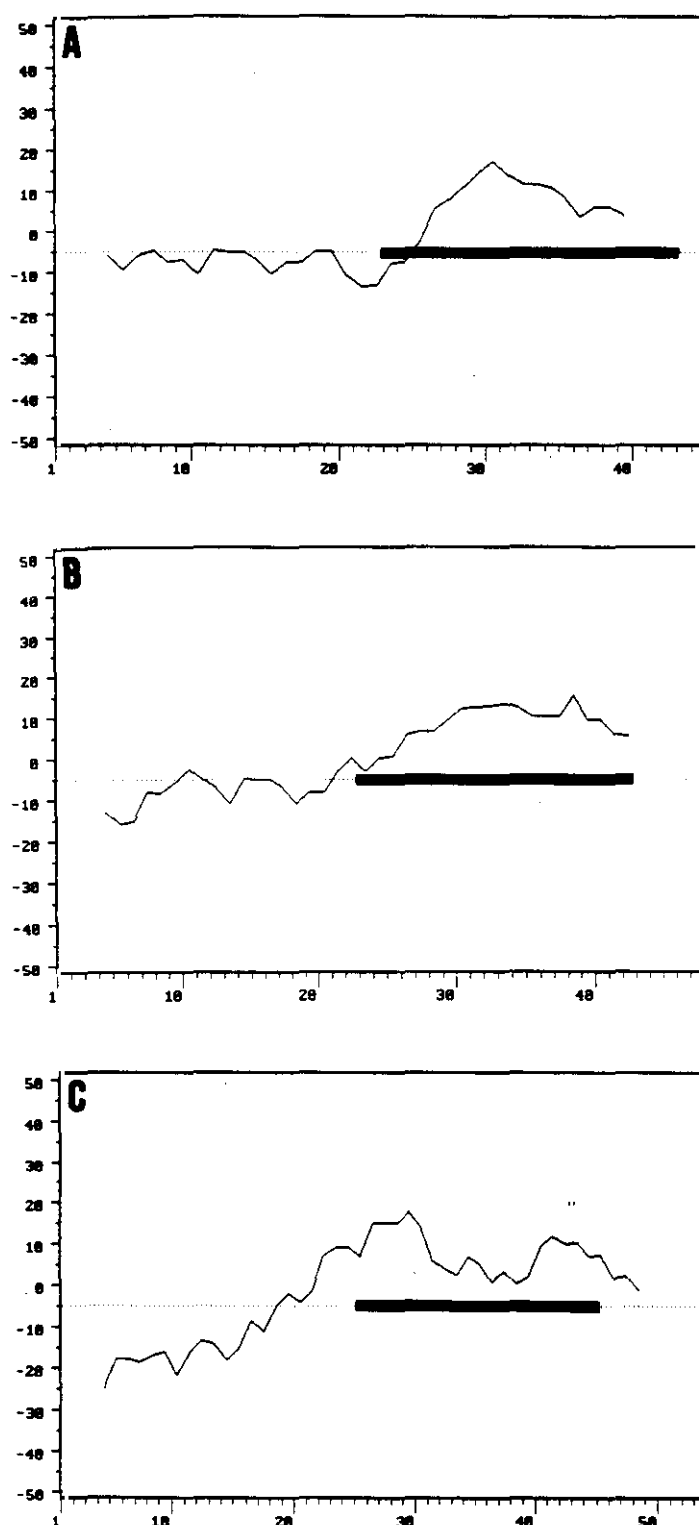


Figura 5.2. Perfil de hidropaticidad y posibles hélices α transmembrana (PTH) de la enterocina P de *E. faecium* P13 (A) y de la enterocina A (B) y enterocina B (C) de *E. faecium* T136.

El perfil de hidropaticidad de las bacteriocinas se determinó mediante el programa SOAP (Kyte y Doolite, 1982) y las posibles hélices α transmembrana (rectángulos negros) se identificaron mediante el programa HELIXMEN (Eisenberg *et al.*, 1984). El eje de abscisas representa el número de residuo aminoacídico de cada bacteriocina; la línea horizontal discontinua de ordenada -5 es la línea divisoria de las regiones aminoacídicas hidrófobas (región superior) e hidrófilas (región inferior).

espontánea durante el almacenamiento y reduce su actividad antimicrobiana 4-10 veces. Aunque no se dispone de la masa molecular por espectrometría de masas de la enterocina P y de la enterocina A, la presencia de dos y cuatro residuos de cisteína en la molécula, respectivamente (Figura 5.1A), sugiere la posibilidad de que sus grupos sulfhidrilo (-SH) establezcan al oxidarse 1-2 puentes disulfuro (S-S) que actuarían como un enlace covalente transversal entre dos puntos de la misma cadena peptídica. La importancia de estos puentes disulfuro en la actividad biológica de la enterocina P, enterocina B y enterocina A quedó demostrada al observar que el tratamiento con el agente reductor ditionitrito (DTT) disminuyó su actividad antimicrobiana en un 54, 90 y un 99%, respectivamente (secciones IV.9.6 y IV.11.6). Experimentos realizados por Fimland *et al.* (1996) con la pediocina PA-1, sakacina A, curvacina A y leucocina A-UAL187, así como con los péptidos sintéticos correspondientes, permitieron sugerir que el establecimiento de estos puentes disulfuro tiene lugar de forma espontánea. Es interesante destacar que aunque la leucocina A-UAL187 contiene dos residuos de cisteína en su extremo N-terminal, al igual que todas las bacteriocinas del tipo pediocina, la reducción del puente disulfuro correspondiente no afecta a su actividad antimicrobiana (Hastings *et al.*, 1991), a diferencia de lo observado para otras bacteriocinas del grupo (Fimland *et al.*, 1997) y para las enterocinas P y A.

Las estructuras conformacionales características de las proteínas de membrana son la lámina plegada, constituida por conformaciones β o en zig-zag antiparalelas unidas transversalmente por enlaces de hidrógeno, y la estructura consistente en varias hélices α paralelas que atraviesan la membrana. Las enterocinas P, B y A poseen secuencias aminoacídicas que permiten la formación de pequeñas hélices α transmembrana anfifílicas de 21 aminoácidos (Figura 5.2), lo que permite sugerir que se trata de proteínas activas a nivel de membrana cuyo mecanismo de acción primario es la formación de poros o canales iónicos en las membranas citoplasmáticas de las células sensibles, como se ha descrito para las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Ocjius y Young, 1991; Bruno y Montville, 1993; Abee *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996) (sección II.4.3; Figura 5.2). El elevado porcentaje de residuos de glicina en las enterocinas P y A les permitiría una gran flexibilidad conformacional, favorecida por la ausencia de prolina, en el caso de la enterocina P, o por la presencia de un único residuo en la enterocina A. Asimismo, la enterocina B presenta un elevado porcentaje de glicina pero, sin embargo, contiene cuatro residuos de prolina, dos en la región N-terminal y dos en la C-terminal, lo que restringiría su flexibilidad conformacional y podría estar relacionado con su actividad biológica. En estas tres bacteriocinas los residuos de glicina constituyen el 25% de las PTHs, lo que contribuiría según Vogel *et al.* (1993) a la estabilización de los poros en la membrana.

Recientemente, Chen *et al.* (1997) han sugerido la existencia de una estructura terciaria consenso para los primeros 19 aminoácidos del extremo N-terminal de la pediocina PA-1, que estaría constituida por dos conformaciones β o en zig-zag conectadas por una horquilla β de 4 aminoácidos originada y estabilizada por residuos de cisteína. La conformación β N-terminal se plegaría debido a un giro en la glicina de la secuencia consenso YGNGV presente inmediatamente antes de la horquilla. Esta hipótesis está en concordancia con las predicciones de los métodos basados en la estructura secundaria y con los resultados bioquímicos que ponen de manifiesto la formación de un puente disulfuro entre los residuos conservados de cisteína de las posiciones 9 y 14 (Jack *et al.*, 1995; Fimland *et al.*, 1996). En el extremo de la horquilla β se

localizan dos residuos básicos (Lys11 e His12) que le confieren carácter catiónico. La conformación del extremo C-terminal de la pediocina PA-1 es más difícil de predecir; no obstante, resultados bioquímicos demuestran que la actividad biológica de esta bacteriocina requiere el establecimiento de un segundo puente disulfuro entre los residuos de cisteína de las posiciones 24 y 44 (Cys24-Cys44) (Chikindas *et al.*, 1993; Fimland *et al.*, 1996). Este nuevo puente disulfuro aproximaría los residuos His(42), Lys(43) y, posiblemente, K(20), creando una segunda región catiónica. La presencia de estos dominios catiónicos en el modelo de la estructura tridimensional de la pediocina PA-1 concuerda con el argumento de que las interacciones electrostáticas desempeñan un papel muy importante en el contacto inicial de esta bacteriocina con los fosfolípidos aniónicos de vesículas lipídicas de *Listeria* spp. Esta unión resultaría también favorecida por las interacciones hidrofóbicas establecidas entre los residuos Val(7), Cys(9), Cys(14), Val(16) y Trp(18) de la pediocina PA-1 y los grupos apolares de la bicapa lipídica (Chen *et al.* 1997). Algunos autores han sugerido que el extremo conservado N-terminal, que contiene la secuencia consenso YGNGV, estaría también relacionado con el reconocimiento de los hipotéticos receptores específicos de las bacteriocinas del tipo pediocina (Aymerich *et al.*, 1996; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996). Las enterocinas P y A comparten estas peculiaridades estructurales con la pediocina PA-1 por lo que se puede hipotetizar que interaccionarían con la membrana de una forma similar, si bien, en el caso de la enterocina P estaría ausente el segundo dominio catiónico debido a que carece de cisteína en su extremo C-terminal. Por otra parte, el dominio C-terminal de estas bacteriocinas es más variable en cuanto a su estructura primaria (Figura 5.1A); no obstante, las predicciones topológicas sugieren una homología conformacional debida a la presencia de posibles hélices α transmembrana, de al menos 20 aminoácidos, que serían responsables de la inserción de las bacteriocinas en el interior de la bicapa lipídica y de la consiguiente formación de las estructuras anfifílicas multiméricas que constituyen los poros o canales iónicos. En las proteínas de membrana, los residuos básicos y aromáticos, principalmente el triptófano, se localizan generalmente en la interfase entre las porciones polares y no polares de la bicapa lipídica, reforzando la estabilidad de las hélices α transmembrana (Schiffer *et al.*, 1992), lo que recientemente ha permitido sugerir a Bhugaloo-Vial *et al.* (1996) la importancia del triptófano y de los residuos de lisina presentes en ambos extremos de la PTH C-terminal de la piscicocina VIA de *Cb. piscicola* VI. Es interesante destacar que en la enterocina P y en la enterocina A se encuentran presentes residuos de lisina y triptófano en el extremo N-terminal de sus PTHs, así como residuos aromáticos en su extremo C-terminal y residuos catiónicos inmediatamente después de la hélice α transmembrana. En la enterocina B los residuos catiónicos están más alejados de la PTH y el triptófano únicamente se encuentra en el extremo C-terminal de la misma. Fimland *et al.* (1996) describieron la importancia del extremo C-terminal de las bacteriocinas del tipo pediocina en su actividad biológica mediante la construcción de moléculas híbridas. En este contexto, la comparación de la secuencia aminoacídica de diversas bacteriocinas de la clase II, del tipo pediocina o no, realizada en nuestro trabajo permite sugerir una posible relación entre la secuencia consenso G/x₁WAx₂G de sus extremos C-terminales y su actividad antimicrobiana. A este respecto, conviene resaltar que la leucocina A-UAL187 presenta arginina en x₁ y carece del residuo aromático conservado (triptófano) en posición w y, a diferencia de las otras bacteriocinas,

presenta un modo de acción bacteriostático (Stiles, 1994).

Los modelos predictivos de la conformación de las bacteriocinas del tipo pediocina descritos anteriormente se basan en características conservadas de su estructura primaria y secundaria, por lo que *a priori* se podrían aplicar a las enterocinas P y A. La enterocina B presenta ciertas similitudes estructurales con este grupo, no obstante, la ausencia de la secuencia consenso del extremo N-terminal y las diferencias observadas en su tamaño molecular, número de aminoácidos, número y posición de los residuos de cisteína, porcentajes de prolina y de aminoácidos polares y apolares, índices GRAVY y perfiles de hidropaticidad impide aplicarle los modelos predictivos de las bacteriocinas del tipo pediocina y hace pensar que su mecanismo de formación de poros es diferente, como también se ha sugerido para otras bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995 Marciset *et al.*, 1997). En cualquier caso, se requieren estudios bioquímicos y estructurales adicionales de la enterocina P, enterocina A y enterocina B para elucidar su conformación y su modo de inserción en las membranas de las células sensibles.

V.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13 Y DE LA ENTEROCINA B DE *E. faecium* T136

La mayoría de los protocolos descritos para el aislamiento de ADN plasmídico permiten obtener muy bajos rendimientos de plásmidos de elevado tamaño molecular, lo que explicaría las dificultades encontradas inicialmente en este trabajo para aislar el ADN plasmídico de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136. Los protocolos de Birnboim y Doly (1979), O'Sullivan y Kaenhammer (1993) y Sambrook *et al.* (1989) no permitieron aislar el ADN de estas cepas; no obstante, el método de lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos de elevado tamaño molecular de Anderson y McKay (1983) (sección III.2.11.2) permitió aislar e identificar un plásmido de más de 60 Kb en *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 (Figura 4.9; secciones IV.10.2 y IV.12.1). Este método también ha sido empleado con éxito por Martínez-Bueno *et al.* (1994) para el aislamiento de un plásmido de 68 Kb de *E. faecalis* S-48. Por otra parte, Aymerich (1996) empleó este mismo protocolo para el aislamiento del ADN de *E. faecium* CECT492 y obtuvo un perfil plasmídico idéntico al de las cepas *E. faecium* T136 y *E. faecium* P13. En este contexto, es interesante destacar que en nuestro trabajo se ha demostrado que *E. faecium* CECT492 (Aymerich *et al.* 1996) contiene, al igual que *E. faecium* T136, el gen estructural de la enterocina B, además del correspondiente a la enterocina A (Figura 4.30; sección IV.12.7). La presencia de plásmidos de elevado tamaño molecular en cepas de *E. faecium* no resulta sorprendente ya que se ha descrito previamente en otras ocasiones (Parente y Hill, 1992b; Olasupo *et al.*, 1994; Cintas *et al.*, 1998b; Aymerich, 1996).

La producción de enterocina P y la inmunidad a la misma son dos fenotipos muy estables en *E. faecium* P13, como lo demuestra el hecho de que no desaparecieran espontáneamente, ni después de almacenamientos prolongados, ni tras su liofilización o incubación a elevadas temperaturas. Por el contrario, se han descrito bacteriocinas como la lactocina S (Mortvedt y Nes, 1990) y la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975) cuya producción desaparece espontánea y fácilmente en las cepas bacteriocinogénicas. El tratamiento de los cultivos de *E. faecium* P13 con 2,5 y 5,0 µg/ml de novobiocina permitió obtener, respectivamente, un 10 y un 42% de colonias que habían perdido tanto la capacidad de producir enterocina P como su inmunidad, lo que

sugirió que ambos fenotipos se encuentran ligados genéticamente, como confirmó posteriormente la secuenciación del ADN. El empleo de dosis subletales de novobiocina ha sido empleado también para la obtención de mutantes en la producción y/o inmunidad de la lactococcina (Gupta y Batish, 1992), de las plantaricinas S y T (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993) y de las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995), entre otras. El tratamiento de *E. faecium* L50 con 7,5 y 10 µg/ml de novobiocina, concentraciones letales para *E. faecium* P13, sólo permitió obtener, respectivamente, un 9 y un 13% de colonias que habían perdido tanto la capacidad de producir enterocinas L50A y L50B como su inmunidad (Cintas, 1995). Sin embargo, Gupta y Batish (1992) obtuvieron un 72% de mutantes no productores de lactococcina cuando trataron *L. lactis* 484 con 4 µg/ml de novobiocina. Los perfiles plasmídicos de los cuatro mutantes de *E. faecium* P13 analizados resultaron ser idénticos a los de la cepa parental (Figura 4.9), por lo que no se pudo elucidar si los determinantes genéticos asociados a la producción e inmunidad de la enterocina P están localizados en el cromosoma o en el plásmido de más de 60 Kb. En lo que respecta a la localización de los determinantes genéticos de otras enterocinas, las enterocinas L50A y L50B están codificadas en un plásmido de más de 50 Kb de *E. faecium* L50 (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998b), la enterocina A y su hipotética proteína de inmunidad están localizados en el cromosoma de *E. faecium* CECT492 (Aymerich, 1996), la enterocina 01 está codificada posiblemente en un plásmido de 21,5 Kb o en uno de 23 Kb y su hipotética proteína de inmunidad en un plásmido o en el cromosoma de *E. faecium* NA01 (Olasupo *et al.*, 1994) y, por último, la enterocina 226 está codificada en un plásmido conjugativo de 5,2 Kb de *E. faecalis* 226NWC (Salzano *et al.*, 1992).

V.3.1. Análisis de la secuencia nucleotídica de los genes estructurales de la enterocina P y enterocina B y del gen de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P

La secuenciación de un fragmento de ADN de 955 pb de *E. faecium* P13 y su posterior análisis informático reveló la presencia de tres ORFs consecutivos de la misma polaridad, que corresponden al gen estructural de la enterocina P (*entP*), al gen de su hipotética proteína de inmunidad (*entiP*) y a un hipotético gen de función desconocida (*orfX*) (Figuras 4.12 y 4.14; sección IV.10.4). En las regiones inmediatamente anteriores a los genes *entP* y *orfX* se identificaron dos secuencias hexaméricas separadas por 19 y 18 nucleótidos, respectivamente, correspondientes a las regiones -10 y -35 de sus hipotéticos promotores. La secuencia -10 del promotor de *entP* (TATAAT) coincide completamente con la secuencia consenso definida para las ARN polimerasa bacterianas (Rosenberg y Court, 1979; Moran *et al.*, 1982; Hawley *et al.*, 1983; Graves *et al.*, 1986; Van Der Vossen *et al.*, 1987; Koivula *et al.*, 1991) y difiere de la obtenida para *orfX* (TATAAA) únicamente en su último nucleótido. Por otra parte, las secuencias -35 de estos promotores muestran una mayor variabilidad; así, pues, la secuencia -35 del promotor de *entP* (TTATCA) difiere en sus dos nucleótidos internos con la secuencia consenso (TTGACA) y en éstos y el nucleótido final con la secuencia -35 del promotor de *orfX* (TTCAT). Esta mayor variabilidad en la región -35 ha sido observada también por Diep *et al.* (1996) al comparar los hipotéticos promotores asociados a las bacteriocinas de *Lb. plantarum*

C11, *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995), *Lb. sake* Lb674 (Huhne *et al.*, 1995) y *Cb. piscicola* LV17A y LV17B (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995b). Alineamientos realizados por Diep *et al.* (1996) revelaron que en todos estos promotores las secuencias -10 estaban localizadas 6-8 pares de bases delante del nucleótido correspondiente al inicio de la transcripción. Análisis de transcripción (*primer extension analyses*) permitieron identificar el desoxinucleótido dGTP como el punto de inicio de la transcripción de las plantaricinas A, EF, JK y N de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996) y de las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 de *Cb. piscicola* LV17 (Saucier *et al.*, 1997), entre otras. En base a estos resultados y a las similitudes encontradas con el promotor de *entP* es posible hipotetizar que el inicio de la transcripción de éste correspondería al desoxinucleótido dGTP localizado 8 pares de bases detrás de la región -10 de su hipotético promotor (Figura 4.12). Desde hace tiempo se tiene constancia de que la mayoría de los reguladores de la transcripción (proteínas efectoras) se unen específicamente al ADN en regiones próximas o incluidas en el promotor y potencian o reprimen la unión de la ARN polimerasa, regulando por tanto la iniciación de la transcripción (León y García, 1992). Frecuentemente, estructuras como las secuencias repetidas directas e inversas se han identificado como lugares de unión de las proteínas reguladoras de la transcripción (Huo *et al.*, 1988; Ptashne, 1992). Aunque aún no se han realizado estudios sobre la regulación del promotor de *entP*, la presencia de algunos elementos característicos en esta región sugiere que el operón de la enterocina P está regulado. Así, por ejemplo, se identificaron dos juegos de secuencias repetidas directas (SRD1 y SRD2) y uno de secuencias repetidas inversas de 10 pares de bases (SRI) en la región del promotor (Figura 4.12). Las SRD1 contienen 9 pares de bases (identidad del 78%) y están espaciadas por una región de 12 nucleótidos rica en A y T, lo que las asemeja a las cajas reguladoras conservadas identificadas por Diep *et al.* (1996) en los sistemas de las bacteriocinas de *Lb. plantarum* C11, *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995), *Lb. sake* Lb674 (Huhne *et al.*, 1995) y *Cb. piscicola* LV17A y LV17B (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995b). Diep *et al.* (1996) también identificaron estas cajas conservadas en los sistemas de regulación de dos componentes *agr* y similares de *St. aureus* y *St. lugdunensis*, respectivamente (Janzon *et al.*, 1989; Vandenesch *et al.*, 1993), lo que les permitió sugerir que estos sistemas podrían estar controlados por un mecanismo de regulación similar (sección II.4.8). En este contexto, es interesante destacar que las proteínas histidina quinasa (PHQ) y reguladoras de respuesta (RR) (proteínas efectoras) que los constituyen presentan una elevada homología en su estructura peptídica y que estas últimas contienen un elevado porcentaje de aminoácidos básicos en sus extremos C-terminales, que posiblemente desempeñan un importante papel en su unión a los grupos fosfato aniónicos del ADN en la región de las cajas reguladoras (Diep *et al.*, 1996). Asimismo, todos estos sistemas muestran una organización genética similar en la que los genes correspondientes a la PHQ y al RR están dispuestos en tándem y precedidos por el gen que codifica el correspondiente factor de inducción (*plnA*, *orf4*, *orf1*, *cbnS*) (Figura 2.4; sección II.4.9). Las SRD2 identificadas en la región del promotor de *entP* están constituidas por 9 pares de bases idénticas separadas por una región rica en A y T de 21 nucleótidos. Este espaciamiento indica que estas secuencias estarían localizadas en la misma cara de la doble hélice de ADN (separadas por dos vueltas de hélice) lo que favorecería la unión de las proteínas efectoras (Diep *et al.*, 1996). La identificación de estas

secuencias repetidas directas e inversas en la región del promotor del gen estructural de la enterocina P constituye la primera evidencia de la existencia de mecanismos reguladores de la transcripción de los operones de las bacteriocinas secretadas mediante la Ruta General de Secreción (GSP) o sistema *sec*-dependiente.

Inmediatamente detrás del gen estructural de la enterocina P, y con la misma polaridad, se localiza el gen que codifica su hipotética proteína de inmunidad (*entiP*) (Figuras 4.12 y 4.14; sección IV.10.4). La ausencia de un hipotético promotor en la región 5' de *entiP* sugiere que su expresión está controlada por el promotor de *entP* y que ambos genes forman parte del mismo operón, lo cual es una característica generalizada en la organización genética de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996) (sección II.4.9). No obstante, Cintas *et al.* (1998b) han caracterizado el operón de las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 y tras secuenciar 3,5 Kb del plásmido de más de 50 Kb (pCIZ1) no detectaron la presencia de ningún gen de inmunidad; asimismo, mediante experimentos de transcripción (*northern analyses*) demostraron que los genes estructurales de ambas bacteriocinas constituyen una única y pequeña unidad de transcripción de 400 nucleótidos aproximadamente.

Por otra parte, inmediatamente antes del gen estructural de la enterocina P, y con la misma polaridad, se encuentra un ORF, *orfX*, que podría codificar un péptido de función desconcida de 65 aminoácidos, catiónico, de elevado pI e hidrófobo (Figuras 4.12 y 4.14, Tabla IV.16; sección IV.10.4). La bacteriocina 31 de *E. faecalis* YI17 (Tomita *et al.*, 1996) es, junto con la enterocina P, la única bacteriocina del tipo pediocina que se secreta mediante el sistema *sec*-dependiente descrita hasta la fecha y presenta una organización genética similar. Estos autores secuenciaron un fragmento de 1,5 Kb del plásmido pYI17 (57,5 Kb) de *E. faecalis* YI17 e identificaron el gen estructural de la bacteriocina (*bacA*) seguido del gen de su hipotética proteína de inmunidad (*bacB*) y de un ORF, *orf3*, que codifica una proteína de 90 aminoácidos de función desconocida, detrás del cual se localiza un hipotético terminador *rho*-independiente de la transcripción. Los análisis de transcripción realizados por estos autores permitieron comprobar que estos tres ORFs constituyen una única unidad de transcripción cuyo promotor se encuentra inmediatamente delante de *bacA*.

En lo que respecta a la organización genética de la enterocina B, el análisis informático de la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN de 352 pb de *E. faecium* T136 reveló la presencia de un solo ORF, correspondiente al gen estructural de la bacteriocina (*entB*) (Figura 4.27; sección IV.12.3). En la región nucleotídica localizada delante de *entB* se identificaron dos secuencias que posiblemente corresponden a las regiones -10 (TATAGA) y -35 (TTCAGA) del promotor de su transcripción. Estas secuencias difieren en dos nucleótidos de la secuencia consenso; no obstante, están separadas por una distancia óptima de 16 pb y un nucleótido delante de la secuencia -10 se localiza la pareja TG, que ha sido identificada en otros promotores de bacteriocinas de bacterias lácticas como la sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995) y las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 de *Cb. piscicola* LV17A y LV17B (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995b). En la región del hipotético promotor no se identificaron cajas reguladoras de la transcripción similares a las descritas inicialmente por Diep *et al.* (1996) pero, sin embargo, se localizaron dos secuencias repetidas directas perfectas de 10 pb, una de ellas localizada en las cercanías del promotor y la otra a unas 200 pb en la dirección de

la transcripción, dentro de la secuencia del gen estructural de la enterocina B, que podrían estar involucradas en la regulación de su expresión. Inmediatamente después de *entB* se identificó una región palindrómica seguida de una cola de timinas que podría formar una estructura en horquilla estable y actuar como un terminador *rho*-independiente de la transcripción del gen estructural de la enterocina B (Platt, 1986; León y García, 1992). Worobo *et al.* (1994) secuenciaron un fragmento de 2,4 Kb del plásmido pCP49 (49 MDa) de *Cb. piscicola* LV17A e identificaron un solo ORF, *cbnA*, correspondiente al gen estructural de la carnobacteriocina A, la única bacteriocina descrita que presenta homología significativa con la enterocina B. A continuación de *cbnA* se identificó una región palindrómica que podría actuar como un terminador *rho*-independiente de su transcripción. Por lo tanto, la organización genética de la carnobacteriocina A, y probablemente de la enterocina B, es diferente a la de la práctica totalidad de las bacteriocinas de la clase II descritas hasta la fecha ya que el gen que codifica la proteína de inmunidad no se localiza inmediatamente debajo del gen estructural de la bacteriocina.

V.3.2. Estudio comparativo de la secuencia aminoacídica y de los parámetros físico-químicos de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P y de las de otras bacteriocinas de la clase II

El principal mecanismo responsable de la inmunidad de las bacterias lácticas a sus propias bacteriocinas es la síntesis de una proteína específica que carece de extensión N-terminal y que se asocia a la membrana impidiendo que las bacteriocinas ejerzan su efecto tóxico sobre la células productoras (Nes *et al.*, 1996) (sección II.4.5). Hasta la fecha, las únicas proteínas de inmunidad purificadas son las asociadas a la lactococcina A (LCIA) (Nissen-Meyer *et al.*, 1993b) y a la carnobacteriocina B2 (CBI B2) (Quadri *et al.*, 1995a), que están constituidas por 98 y 111 aminoácidos, respectivamente, son catiónicas (carga neta a pH 7,0 de 3), de elevado pI (9,3 y 9,9) (Tabla V.3), contienen varios dominios hidrófobos y no presentan modificaciones postraduccionales. No obstante, se han descrito numerosas hipotéticas proteínas de inmunidad a partir de la secuencia nucleotídica de los operones de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en base a similitudes estructurales con otras descritas previamente (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). En este contexto, el análisis informático de la secuencia aminoacídica deducida del ORF localizado inmediatamente debajo del gen estructural de la enterocina P de *E. faecium* P13 reveló que se trataba de una hipotética proteína de inmunidad (ENTI P). ENTI P muestra una identidad (porcentaje de residuos idénticos) con las hipotéticas proteínas de inmunidad de la bacteriocina 31 de *E. faecalis* YI17 (BACI 31) (Tomita *et al.*, 1996), sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (SAKI A) (Axelsson y Holck, 1995) y carnobacteriocina BM1 de *Cb. piscicola* LV17B (CBI BM1) (Quadri *et al.*, 1995b; 1997b) del 52, 47 y 44%, respectivamente. Como se observa en la Figura 5.3 la homología entre las hipotéticas proteínas de inmunidad es mayor en su extremo C-terminal; así, pues, el 53-54% de los últimos 41/42 residuos aminoacídicos son idénticos o similares en las cuatro proteínas. El mayor grado de conservación de la región C-terminal fue descrito inicialmente por Aymerich *et al.* (1996) cuando compararon la secuencia aminoacídica de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina A (ENTI A) de *E. faecium* CECT492 con la de la leucocina A-UAL187 de *Lc. gelidum* A-UAL187 (Hastings *et al.*, 1992). Aymerich *et al.*

Tabla V.3. Parámetros físico-químicos de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de diversas proteínas de inmunidad de otras bacteriocinas de la clase II

| | Pm (Da) | Nº aa | % de aminoácidos | | | | | | Aminoácidos ausentes | Carga neta ^a | pl | Índice GRAVY | Nº PTHs |
|--------|------------|----------|------------------|----------|----|---------|----|----|-------------------------|----------------------------|-------|-----------------|------------|
| | | | Gly | apolares | | polares | | | | | | | |
| | | | | Af | Ar | Nt | Ac | Bs | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| ENTIP | 9.886 | 88 | 5 | 35 | 10 | 20 | 13 | 17 | H | 4 | 9,79 | -3,56 | - |
| BACI31 | 10.321 | 90 | 4 | 37 | 8 | 26 | 12 | 13 | C, H | 1 | 9,24 | -3,56 | - |
| SAKIA | 10.458 | 90 | 1 | 37 | 11 | 22 | 11 | 18 | H | 6 | 10.12 | -2,78 | - |
| CBIBM1 | 10.189 | 88 | 2 | 40 | 9 | 20 | 13 | 16 | C | 2 | 9,51 | -2,56 | - |
| LCIA | 11.164 | 98 | 4 | 38 | 6 | 24 | 12 | 16 | V, C | 3 | 9,97 | -3,82 | - |
| CBIB2 | 12.666 | 111 | 4 | 36 | 10 | 27 | 10 | 13 | W | 3 | 9,31 | -2,03 | - |

ENTIP es la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P de *E. faecium* P13; BACI31 es la hipotética proteína de inmunidad de la bacteriocina 31 de *E. faecalis* Y117 (Tomita *et al.*, 1996); SAKI A es la hipotética proteína de inmunidad de la sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995); CBI BM1 es la hipotética proteína de inmunidad de la carnobacteriocina BM1 de *Cb. piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1995b; 1997b); LCI A es la proteína de inmunidad de la lactococcina A de *L. cremoris* LMG2130 (Nissen-Meyer *et al.*, 1993b) y CBI B2 es la proteína de inmunidad de la carnobacteriocina B2 de *Cb. piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1995a; 1997b).

^aCarga neta a pH 7.0. Símbolos y abreviaturas como el la Tabla V.1.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| ENTIP | - | - | M | K | S | N | - | K | S | F | N | K | V | L | E | L | T | E | T | A | L | A | T | P | E | I | K | K | D | K | N | L | C | E | I | L | E | K | V | K | A | S | A | A | K | G | E | F | Y | Y | 47 |
| BACI 31 | M | D | I | K | K | K | - | E | A | L | E | K | I | I | Q | L | T | N | N | A | L | A | N | P | Q | I | Y | S | D | K | N | L | N | D | L | L | L | R | I | R | K | E | A | L | S | G | E | V | F | Y | 49 |
| SAKIA | - | - | M | K | A | D | Y | K | K | I | N | S | I | L | T | Y | T | S | T | A | L | K | N | P | K | I | I | K | D | K | D | L | V | V | L | L | T | I | I | Q | E | E | A | K | Q | N | R | I | F | Y | 48 |
| CBI BM1 | - | - | M | I | K | D | - | E | K | I | N | K | I | Y | A | L | V | K | S | A | L | D | N | T | D | V | K | N | D | K | L | S | L | L | L | M | R | I | Q | E | T | S | I | N | G | E | L | F | Y | 47 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| ENTIP | D | Y | K | K | E | F | Q | P | A | I | S | G | F | T | I | R | N | G | F | S | T | P | K | V | L | L | E | L | L | A | E | V | K | T | P | K | A | W | S | G | L | - | 88 |
| BACI 31 | D | L | K | K | E | L | Q | P | T | I | S | G | F | T | L | R | N | N | F | Q | T | P | S | E | L | L | E | L | L | T | L | I | Q | T | P | K | G | W | S | G | F | - | 90 |
| SAKIA | D | I | K | R | K | F | R | P | A | V | T | R | F | T | I | D | N | N | F | E | I | P | D | C | L | V | K | L | L | S | A | V | E | T | P | K | A | W | S | G | F | S | 90 |
| CBI BM1 | D | Y | K | K | E | L | Q | P | A | I | S | M | Y | S | I | Q | H | N | F | R | V | P | D | D | L | V | K | L | L | A | L | V | Q | T | P | K | A | W | S | G | F | - | 88 |

Figura 5.3. Comparación de la secuencia aminoacídica de la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P de *E. faecium* P13 con la de otras proteínas de inmunidad de diversas bacteriocinas de la clase II.

ENTIP es la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P de *E. faecium* P13; BACI31 es la hipotética proteína de inmunidad de la bacteriocina 31 de *E. faecalis* Y117 (Tomita *et al.*, 1996); SAKIA es la hipotética proteína de inmunidad de la sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995) y CBI BM1 es la hipotética proteína de inmunidad de la carnobacteriocina BM1 de *Cb. piscicola* LV17B (Quadri *et al.*, 1995b; 1997b). A la derecha del extremo C-terminal de cada secuencia se indica el número de aminoácidos de la proteína de inmunidad. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

(1996) observaron que la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina A mostraba una identidad con la de la leucocina A-UAL-187 del 44 % pero que, sin embargo, no mostraba homología significativa con la correspondiente a la pediocina PA-1, a pesar de que ésta es la bacteriocina que muestra mayor homología con la enterocina A (56% frente a un 46% con la leucocina A-UAL187). Resultados similares se han obtenido en este trabajo al comparar la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P con las correspondientes a la enterocina A y a la leucocina A-UAL187, ya que muestran una identidad de sólo un 8 y un 4%, respectivamente, a pesar de que estas bacteriocinas del tipo pediocina presentan una elevada identidad con la enterocina P (49 y 45%, respectivamente). Por el contrario, la hipotética proteína de inmunidad de la enterocina P muestra una identidad máxima del 52% con la correspondiente a la bacteriocina 31, que también es una bacteriocina del tipo pediocina secretada a través del sistema *sec*-dependiente y cuya identidad con la enterocina P es del 44%. La identidad de las hipotéticas proteínas de inmunidad de la sakacina A y de la carnobacteriocina BM1 con la correspondiente a la enterocina P es ligeramente inferior (47 y 44%, respectivamente), a pesar de que estas bacteriocinas del tipo pediocina son las que presentan una mayor identidad con la enterocina P (80 y 74%, respectivamente). De estos resultados se puede deducir que el grado de homología de dos bacteriocinas no está siempre directamente relacionado con la similitud de sus proteínas de inmunidad correspondientes, pero que, por el contrario, las proteínas de inmunidad que presentan una gran homología corresponden siempre a bacteriocinas similares (identidad del 40-50% ó superior). Asimismo, la identidad entre las hipotéticas proteínas de inmunidad de las bacteriocinas del tipo pediocina enterocina P, bacteriocina 31, sakacina A y carnobacteriocina BM1 permite sugerir que podrían proteger a los microorganismos productores del efecto tóxico de las cuatro bacteriocinas.

A parte de sus homologías estructurales, las hipotéticas proteínas de inmunidad de las bacteriocinas del tipo pediocina enterocina P, bacteriocina 31, sakacina A y carnobacteriocina BM1 poseen parámetros físico-químicos similares (Tabla V.3). Todas ellas contienen un mayor número de aminoácidos (entre 88 y 111) que las bacteriocinas correspondientes, son catiónicas (carga neta a pH 7,0 entre 1 y 6), de elevado pI (entre 9,2 y 10,1) y son relativamente hidrófobas (índices GRAVY entre -2,56 y -3,56). Asimismo, a diferencia de las bacteriocinas de las que protegen, estas proteínas poseen un bajo porcentaje de glicina (entre un 1 y un 5%) y carecen del aminoácido azufrado cisteína o contienen un solo residuo. Por último, los análisis informáticos de estas proteínas de inmunidad predicen que no se trata de proteínas de membrana integrales sino periféricas, cuya interacción con la membrana resultaría favorecida por los diversos dominios hidrófobos que contienen (Figura 5.4).

V.3.3. Relación entre la extensión N-terminal de la enterocina P y enterocina B y su procesamiento y transporte

La práctica totalidad de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se sintetizan en los ribosomas como preprobacteriocinas que contienen extensiones N-terminales de 18-32 aminoácidos (secuencia líder del tipo doble glicina o péptido señal) que definen su sistema de procesamiento y transporte (Tabla V.4). Estas extensiones dirigen a las preprobacteriocinas hacia la membrana citoplasmática y facilitan su interacción con las proteínas transportadoras y/o con

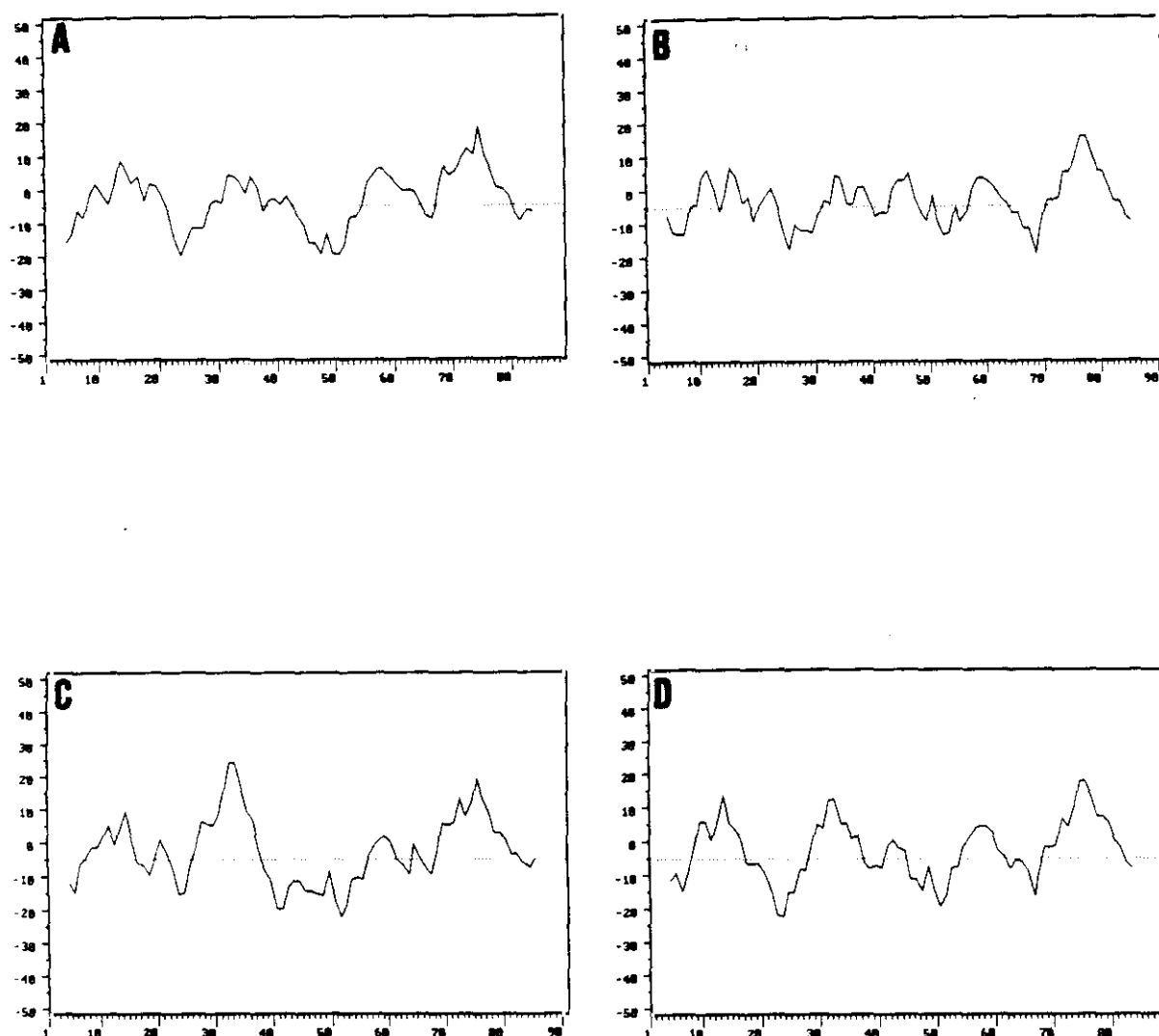


Figura 5.4. Perfil de hidropaticidad de las hipotéticas proteínas de inmunidad de la enterocina P (ENTI P) de *E. faecium* P13(A), bacteriocina 31 (BACI 31) (B), sakacina A (SAKIA) (C) y carnobacteriocina BM1 (CBI BM1) (D).

El perfil de hidropaticidad de las bacteriocinas se determinó mediante el programa SOAP (Kyte y Doolite, 1982). El eje de abscisas representa el número de residuo aminoacídico de cada proteína de inmunidad; la línea horizontal discontinua de ordenada -5 es la línea divisoria de las regiones aminoacídicas hidrófobas (región superior) e hidrófilas (región inferior). Referencias como en la Figura 5.3.

TABLA V.4. Secuencia aminoacídica de la preproenterocina P, preproenterocina B, preproenterocina A y diversas preprobacteriocinas de la clase II producidas por bacterias lácticas

| | Extensión N-terminal | | | | | Dominio C-terminal (probacteriocina) | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-----|-----|----|----|--------------------------------------|----|----|----|----|
| | -30 | -20 | -10 | -1 | +1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Sistemas de un péptido | | | | | | | | | | |
| Enterocina A | | | | | | | | | | |
| Pediocina PA-1 ^a | | | | | | | | | | |
| Leucocina A-UAL187 | | | | | | | | | | |
| Mesentericina Y105 | | | | | | | | | | |
| Sakacina A ^b | | | | | | | | | | |
| Sakacina P ^c | | | | | | | | | | |
| Carnobacteriocina BM1 | | | | | | | | | | |
| Carnobacteriocina B2 | | | | | | | | | | |
| Enterocina P | | | | | | | | | | |
| Bacteriocina 31 | | | | | | | | | | |
| Enterocina B | | | | | | | | | | |
| Carnobacteriocina A ^d | | | | | | | | | | |
| Lactococcina A | | | | | | | | | | |
| Lactococcina B | | | | | | | | | | |
| Divergicina A | | | | | | | | | | |
| Acidocina B | | | | | | | | | | |
| Sistemas de dos péptidos | | | | | | | | | | |
| Lactococcina M | | | | | | | | | | |
| Lactococcina N | | | | | | | | | | |
| Lactococcina Ga | | | | | | | | | | |
| Lactococcina Gβ | | | | | | | | | | |

La flecha vertical indica el punto de procesamiento de las preprobacteriocinas; Se ha subrayado la secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina y los residuos del aminoácido cisteína; ^a secuencia idéntica a la pediocina ACh; ^b secuencia idéntica a la curvacina A; ^c secuencia idéntica a la sakacina 674 y bavaricina A; ^d secuencia idéntica a la piscicolina 61. Las referencias de las bacteriocinas están indicadas en la sección II.4.1 y Tabla V.5. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

los enzimas responsables de sus modificaciones posttraduccionales y protegen al microorganismo productor, ya que mantienen inactivas biológicamente a las bacteriocinas en el interior celular (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Sahl *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). La única excepción descrita hasta la fecha es el sistema de las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50, ya que estas bacteriocinas se sintetizan ribosomalmente como péptidos activos sin extensión N-terminal (Cintas *et al.*, 1998b). La comparación de las secuencias aminoacídicas parciales obtenidas mediante degradación de Edman de las enterocinas B y A purificadas a homogeneidad con las deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de sus correspondientes genes estructurales puso de manifiesto que estas bacteriocinas se sintetizan en forma de precursores o prepropéptidos cuyo punto de procesamiento se sitúa inmediatamente detrás de los dos residuos consecutivos de glicina de sus correspondientes extensiones N-terminales (Figura 4.28; secciones IV.12.3 y IV.12.6). La enterocina B se sintetiza como un precursor o prepropéptido de 71 aminoácidos (7.482 Da). En este trabajo únicamente se secuenciaron los cinco primeros residuos del extremo C-terminal de la extensión N-terminal de la enterocina A de *E. faecium* T136 (Figura 4.29; sección IV.12.6) que resultaron ser idénticos a los obtenidos por Aymerich *et al.* (1996) para la enterocina A de *E. faecium* CECT492. Este resultado, unido a la identidad de ambas bacteriocinas indica que la enterocina A se sintetiza como un precursor o prepropéptido de 65 aminoácidos (6.906 Da) (Aymerich, 1996; Aymerich *et al.*, 1996).

La extensión N-terminal de la enterocina B es menos hidrófoba que la correspondiente a la enterocina A (índices GRAVY de -5,9 y +0,7, respectivamente), si bien ambas son péptidos de membrana periféricos pequeños (18 aminoácidos, 2.034-2.073 Da), catiónicos (carga neta a pH 7,0 de 1 y 2, respectivamente) y de elevado pI (9,7 y 10,2) (Tabla IV.22; sección IV.12.4). Las extensiones N-terminales de las enterocinas B y A cumplen los criterios establecidos por Fremaux *et al.* (1993) y Havarstein *et al.* (1994) para las secuencias líder del tipo doble glicina (sección II.4.6), lo que sugiere que estas bacteriocinas se secretan a través de un sistema de secreción independiente de un péptido señal o sistema *sec*-independiente en el que el reconocimiento, procesamiento, translocación y transporte de las bacteriocinas se lleva a cabo por transportadores ABC específicos y sus proteínas accesorias (Havarstein *et al.*, 1995a) (Figura 2.2; sección II.4.7). Este tipo de secuencias líder en las que los residuos conservados de glicina de sus extremos C-terminales constituyen el punto de reconocimiento y procesamiento se ha identificado en la práctica totalidad de las bacteriocinas de la clase II y en algunos lantibióticos (Havarstein *et al.*, 1994; 1995a; Nes *et al.*, 1996). Havarstein *et al.* (1994) propusieron la siguiente secuencia consenso para las secuencias líder del tipo doble glicina: X*(-15)XaaXaaX*(-12)X**(-11)XaaX**(-9)X**(-8)X*(-7)XaaXaaX*(-4)XaaGly(-2)Gly(-1); donde, Xaa representa aminoácidos no conservados, X* representa residuos aminoacídicos hidrófobos y X** representa residuos aminoacídicos polares. La secuencia líder de la enterocina B coincide completamente con la secuencia consenso propuesta por Havarstein *et al.* (1994) y la correspondiente a la enterocina A solamente difiere en que en la posición -7 presenta treonina en lugar de un residuo aminoacídico hidrófobo. En la Figura 5.5A se comparan las secuencias líder del tipo doble glicina de las enterocinas B y A con las de otras bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina (carnobacteriocina A) o del tipo pediocina cuyo punto de procesamiento también se sitúa inmediatamente después de dos residuos de glicina consecutivos (Tabla V.4). De este

A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Enterocina B | - - - | M | Q | N | V | K | E | L | S | T | K | E | - - - | M | K | Q | I | I | G | G | 18 |
| Carnobacteriocina A | - - - | M | N | N | V | K | E | L | S | I | K | E | - - - | M | Q | Q | V | T | G | G | 18 |
| Sakacina A | - - - | M | N | N | V | K | E | L | S | M | T | E | - - - | L | Q | T | I | T | G | G | 18 |
| Carnobacteriocina BM1 | - - - | M | K | S | V | K | E | L | N | K | K | E | - - - | M | Q | Q | I | N | G | G | 18 |
| Leucocina A-UAL7 | M M N | M | K | P | T | E | S | Y | E | Q | L | D | N S A | L | E | Q | V | V | G | G | 24 |
| Enterocina A | - - - | M | K | H | L | K | I | L | S | I | K | E | - - - | T | Q | L | I | Y | G | G | 18 |
| Sakacina P | - - - | M | E | K | F | I | E | L | S | L | K | E | - - - | V | T | A | I | T | G | G | 18 |
| Mesentericina Y105 | M T N | M | K | S | V | E | A | Y | Q | Q | L | D | N Q N | L | K | K | V | V | G | G | 24 |
| Carnobacteriocina B2 | - - - | M | N | S | V | K | E | L | N | V | K | E | - - - | M | K | Q | L | H | G | G | 18 |
| Pediocina PA-1 | - - - | M | K | K | I | E | K | L | T | E | K | E | - - - | M | A | N | I | I | G | G | 18 |

B

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Enterocina P | M | R | K | K | L | F | S | L | A | L | I | G | I | F | G | L | V | V | T | N | F | G | T | K | V | D | A | 27 |
| Bacteriocina 31 | M | K | K | K | - | - | - | L | V | I | C | G | I | I | G | I | G | F | T | A | L | G | T | N | V | E | A | 24 |

Figura 5.5. Comparación de la secuencia aminoacídica de la secuencia líder del tipo doble glicina de la enterocina B y la enterocina A con la de otras bacteriocinas de la clase II (A) y del péptido señal de la enterocina P con el de la bacteriocina 31(B).

A la derecha del extremo C-terminal de cada secuencia se indica el número de aminoácidos de la molécula. Código monosílabo de los aminoácidos como en la Figura 4.8.

alineamiento es interesante destacar que las secuencias líderes analizadas presentan un segundo dominio catiónico en su extremo N-terminal (en las posiciones -13, -14, -16 y -17), además del dominio catiónico identificado por Fremaux *et al.* (1993) entre las posiciones -8 y -10. De acuerdo con las predicciones de la estructura secundaria y los estudios de diroísmo circular y resonancia magnética nuclear realizados en lantibióticos, se ha propuesto que la secuencia líder en ambientes lipofílicos adoptaría una conformación en hélice α que se desestabilizaría por los residuos consecutivos de glicina, originándose entonces un giro β a este nivel, lo que facilitaría la actuación de las proteasas específicas correspondientes (Bycroft *et al.*, 1991; Beck-Sickinger y Jung, 1991). Debido a la gran homología en la estructura de las secuencias líder del tipo doble glicina (Fremaux *et al.*, 1993; Havarstein *et al.*, 1994) (Figura 5.5A) es posible expresar varias bacteriocinas en hospedadores heterólogos empleando únicamente la maquinaria transportadora ABC específica de una de las bacteriocinas. En este contexto, Allison *et al.* (1995) expresaron los dos componentes de la lactacina F de *Lb. johnsonii* VPI11088 en *Cb. piscicola* LV17, una cepa que produce las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 (Ahn y Stiles, 1990b; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1994; Saucier *et al.*, 1995). Por otra parte, Eric Emond construyó genéticamente híbridos de la pre-lactococcina A y la prepediocina PA-1 intercambiando las secuencias líderes y con ellos transformó la cepa *L. lactis* IL1403 (Venema *et al.*, 1996b) que contiene en su cromosoma los genes que codifican la maquinaria necesaria para la secreción de la lactococcina A. Todas las bacteriocinas híbridas fueron secretadas y activas, lo que indica que el transportador ABC de la lactococcina A también reconoció la secuencia líder de la pediocina PA-1 y la procesó en las moléculas correspondientes. Resultados preliminares sugieren que la maquinaria de secreción de la pediocina PA-1 también es capaz de reconocer y procesar algunas de estas bacteriocinas híbridas (Venema, 1995).

La comparación de la secuencia aminoacídica parcial obtenida por degradación de Edman de la enterocina P purificada a homogeneidad con la deducida a partir de la secuencia nucleotídica de su correspondiente gen estructural puso de manifiesto que esta bacteriocina se sintetiza en forma de un precursor de 71 aminoácidos (7.552 Da) cuyo punto de procesamiento se sitúa inmediatamente detrás de los residuos Val-Asp-Ala de su extensión N-terminal (Figura 4.13; sección IV.10.4). La extensión N-terminal de la enterocina P es un péptido catiónico (carga neta a pH 7,0 de 3) y de elevado pI (11,1), al igual que las secuencias líderes de las enterocinas B y A. Por el contrario, la extensión N-terminal de la enterocina P (27 aminoácidos) presenta un tamaño molecular superior (2.940 Da), un mayor carácter hidrófobo (índice GRAVY de +8,92) y se predice como una proteína de membrana integral con una posible hélice α transmembrana (PTH) entre las posiciones -23 (Leu) y -7 (Phe) (Tabla IV.16; sección IV.10.5). Esta extensión N terminal cumple la "regla del -3-1" de Von Heijne (1984) y contiene los tres dominios característicos (dominios N, H y C) (Perlman y Halvorson, 1983; Von Heijne, 1986; Izard y Kendall, 1994) (sección II.4.6) de los péptidos señal que dirigen la secreción de proteínas a través de la Ruta General de Secreción dependiente de un péptido señal o sistema *sec*-dependiente en la que intervienen los productos de los genes *sec* y las peptidasas dependientes de un péptido señal (Gierasch, 1989; Wandersman, 1992; Pugsley, 1993) (sección II.4.7).

Hasta la fecha, las únicas bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas que se sintetizan como precursores con un péptido señal y que, por tanto, se procesan y secretan a través del

sistema *sec*-dependiente son la acidocina B de *Lb. acidophilus* M46 (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A de *Cb. divergens* LV13 (Worobo *et al.*, 1995) y la bacteriocina 31 de *E. faecalis* YI17 (Tomita *et al.*, 1996). La bacteriocina 31 es, al igual que la enterocina P de *E. faecium* P13, una bacteriocina de la clase II del tipo pediocina (Tabla V.4); no obstante, la bacteriocina 31 aún no se ha purificado a homogeneidad, por lo que el punto de procesamiento de la preprobacteriocina se ha determinado únicamente en base a su caracterización genética y a sus homologías con otros péptidos señal. Por el contrario, la acidocina B y la divergicina A ya se han caracterizado bioquímicamente y genéticamente y, a diferencia de la enterocina P y la bacteriocina 31, son bacteriocinas de la clase II no del tipo pediocina (Ten Brink *et al.*, 1994; Van der Vossen *et al.*, 1994; Leer *et al.*, 1995; Worobo *et al.*, 1995) (Tabla V.4).

De forma general los péptidos señal de las proteínas de procariotas y eucariotas carecen de homología en su estructura primaria aunque presentan características físico-químicas similares (Izard y Kendall, 1994). Sin embargo, el péptido señal de la enterocina P (27 aminoácidos) presenta una homología del 50% con el de la bacteriocina del tipo pediocina bacteriocina 31 (24 aminoácidos) (Figura 5.5B). Asimismo, es interesante destacar que en la preproenterocina P y en la preprobacteriocina 31 el punto de procesamiento y los primeros aminoácidos de las bacteriocinas maduras están muy conservados y presentan la secuencia Val(-3)Asp/Glu(-2)-Asp(-1)-Ala(+1)-Thr(+2) (Tabla V.4). Además, la región N-terminal o dominio N del péptido señal de ambas preprobacteriocinas presenta tres residuos catiónicos (principalmente lisina) y la secuencia Lys/Arg-Lys-Lys. En el resto del péptido señal el grado de conservación es menor, en lo que respecta al residuo aminoacídico concreto, si bien, la mayoría de las posiciones están ocupadas por residuos aminoacídicos de características físico-químicas similares (hidrofobicidad, tamaño y carga neta). Por otra parte, la homología del péptido señal de la enterocina P con los correspondientes a las bacteriocinas no del tipo pediocina divergicina A (29 aminoácidos) y acidocina B (32 aminoácidos) es de únicamente el 26 y el 22%, respectivamente.

El hecho de que la enterocina P de *E. faecium* P13 se procese y transporte mediante la Ruta General de Secreción o sistema *sec*-dependiente representa una importante ventaja para este microorganismo ya que permite una considerable disminución de la información genética requerida para su secreción específica. Por otra parte, el que el procesamiento y transporte de esta bacteriocina no requiera la intervención de un transportador ABC específico, unido a la ubiquidad de las peptidasas dependientes de un péptido señal en las células bacterianas, permite sugerir que, en principio, la enterocina P se podría expresar en cualquier bacteria. En este contexto, es interesante destacar que la bacteriocina *sec*-dependiente divergicina A de *C. divergens* LV13 se ha expresado en *L. lactis* y *E. coli* mediante el GSP (Worobo *et al.*, 1995; Van Belkum *et al.*, 1997). Por otra parte, McCormick *et al.* (1996) construyeron genéticamente moléculas híbridas de precarnobacteriocina B2 empleando esta bacteriocina *sec*-independiente y el péptido señal de la divergicina A y las expresaron en *C. divergens* LV13 (Worobo *et al.*, 1995). La detección de carnobacteriocina B2 y divergicina A en los sobrenadantes de *C. divergens* LV13 demuestra la posibilidad de obtener mediante ingeniería genética cepas capaces de expresar varias bacteriocinas a través del sistema *sec*-dependiente. Asimismo, Van Belkum *et al.* (1997) han demostrado que las secuencias líder del tipo doble glicina de la leucocina A-UAL187 de *Lc. gelidum* A-UAL187 (Van Belkum y Stiles, 1995) y de la lactococcina A de *L.*

lactis IL1403 (pMB500) (Venema *et al.*, 1989; Stodard *et al.*, 1992) actúan como señales de transporte capaces de dirigir la secreción de la divergicina A empleando la maquinaria transportadora ABC de ambos hospedadores.

Los resultados de las experiencias genéticas anteriores permiten hipotetizar que se podría expresar la enterocina P de *E. faecium* P13 en la cepa *E. faecium* T136 productora de enterocina B y enterocina A. Para ello, se podría expresar directamente la preproenterocina P empleando el GSP de *E. faecium* T136, o bien, se podría expresar una molécula híbrida que contenga la enterocina P y la secuencia líder del tipo doble glicina de la enterocina B o de la enterocina A, empleando el(los) transportador(es) ABC específico(s) de las bacteriocinas de *E. faecium* T136. Desde un punto de vista aplicado en la industria alimentaria, el empleo de bacterias lácticas modificadas genéticamente para producir varias bacteriocinas de amplio espectro y diferente mecanismo de acción permitiría reducir las tasas de resistencias espontáneas e incrementar su efectividad frente a microorganismos alterantes y/o patógenos como *Cl. tyrobutyricum*, *Prop. acidipropionici*, *Ls. monocytogenes*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum* y *St. aureus*.

Finalmente, las características bioquímicas y genéticas de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de la enterocina B de *E. faecium* T136, así como de otras bacteriocinas como la carnobacteriocina A (Worobo *et al.*, 1994), la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) y las lactococcinas A y B (Van Belkum *et al.*, 1991a; 1992), sugieren la necesidad de modificar una vez más la clasificación de las bacteriocinas de la clase II de las bacterias lácticas (sección II.3.3), ya que ponen de manifiesto que las bacteriocinas del tipo pediocina y no del tipo pediocina se pueden secretar tanto mediante transportadores ABC específicos y sus proteínas accesorias (sistema *sec*-independiente) como a través de la Ruta General de Secreción (GSP) (sistema *sec*-dependiente). Las bacteriocinas de la clase II de las bacterias lácticas son péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño molecular, termoestables, catiónicos, hidrófobos, sin aminoácidos modificados posttraduccionalmente y sintetizados en los ribosomas. A excepción de las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.* 1998b), todas las bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas hasta la fecha se sintetizan en forma de precursores biológicamente inactivos que contienen una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal). La clasificación que se propone en este trabajo para las bacteriocinas de la clase II que se sintetizan como prepéptidos se basa en tres criterios: (i) número de moléculas peptídicas requeridas para que ejerzan su actividad antimicrobiana total, (ii) presencia o ausencia de la secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina en su extremo N-terminal y (iii) mecanismo de secreción responsable de su procesamiento y transporte al medio exocelular (Tabla V.5). Atendiendo a que la actividad antimicrobiana total sea debida a la presencia de una única molécula peptídica o a la acción combinada de dos péptidos, las bacteriocinas de la clase II se clasifican en: IIa, sistemas de un péptido y IIb, sistemas de dos péptidos. Los sistemas de un péptido incluyen la mayoría de las bacteriocinas de la clase II descritas y caracterizadas hasta la fecha y comprenden los grupos IIa-P, bacteriocinas del tipo pediocina, y IIa-NP, bacteriocinas no del tipo pediocina. Atendiendo a los mecanismos de procesamiento y transporte de estas bacteriocinas estos grupos se dividen, a su vez, en sistemas *sec*-dependientes y sistemas *sec*-independientes. En lo que respecta a los sistemas de dos péptidos (IIb), todas las bacteriocinas descritas y caracterizadas hasta el momento son no del tipo pediocina (IIb-NP) y se procesan y transportan mediante

Tabla V.5. Clasificación propuesta para las bacteriocinas de la clase II de las bacterias lácticas^a

GRUPO IIa. SISTEMAS DE UN PÉPTIDO**IIa-P. Bacteriocinas del tipo pediocina****IIa-P-sec-independientes**

| | | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|
| Pediocina PA1 (1) | <i>P. acidilactici</i> PAC-1.0 | Venema <i>et al.</i> (1995) |
| Pediocina Ach (1) | <i>P. acidilactici</i> Z102 | Cintas <i>et al.</i> (1998a) |
| | <i>P. acidilactici</i> H | Bukhtiyarova <i>et al.</i> (1994) |
| Leucocina A-UAL187 | <i>Lc. gelidum</i> UAL187 | Van Belkum y Stiles (1995) |
| Mesentericina Y105 | <i>Lc. mesenteroides</i> Y105 | Fremaux <i>et al.</i> (1995) |
| Sakacina A (2) | <i>Lb. sake</i> LB706 | Axelsson y Holck (1995) |
| Curvacina A (2) | <i>Lb. curvatus</i> LTH1174 | Tichaczek <i>et al.</i> (1993) |
| Sakacina P (3) | <i>Lb. sake</i> LTH673 | Tichaczek <i>et al.</i> (1994) |
| Sakacina 674 (3) | <i>Lb. sake</i> LB674 | Huhne <i>et al.</i> (1996) |
| Acidocina A | <i>Lb. acidophilus</i> TK9201 | Kanatani <i>et al.</i> (1995) |
| Carnobacteriocina BM1 | <i>C. piscicola</i> LV17B | Quadri <i>et al.</i> (1995b) |
| Carnobacteriocina B2 | <i>C. piscicola</i> LV17B | Quadri <i>et al.</i> (1997b) |
| Enterocina A | <i>E. faecium</i> CTC492 | Aymerich <i>et al.</i> (1996) |
| | <i>E. faecium</i> T136 | Este trabajo; Casaús <i>et al.</i> (1997) |

IIa-P-sec-dependientes

| | | |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------------------|
| Bacteriocina 31 | <i>E. faecalis</i> PY117 | Tomita <i>et al.</i> (1996) |
| Enterocina P | <i>E. faecium</i> P13 | Este trabajo; Cintas <i>et al.</i> (1997) |

IIa-NP. Bacteriocinas no del tipo pediocina**IIa-NP-sec-independientes**

| | | |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| Lactococcinas A y B | <i>L. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum <i>et al.</i> (1991a; 1992) |
| | <i>L. lactis</i> WM4 | Stoddard <i>et al.</i> (1992) |
| | <i>L. cremoris</i> LMG2130 | Holo <i>et al.</i> (1991) |
| Carnobacteriocina A (4) | <i>C. piscicola</i> LV17A | Worobo <i>et al.</i> (1994) |
| Piscicolina 61 (4) | <i>C. piscicola</i> LV61 | Holck <i>et al.</i> (1994b) |
| Enterocina B | <i>E. faecium</i> T136 | Este trabajo; Casaús <i>et al.</i> (1997) |
| | <i>E. faecium</i> CECT492 | Este trabajo; Nilsen <i>et al.</i> (1998) |

IIa-NP-sec-dependientes

| | | |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| Acidocina B | <i>Lb. acidophilus</i> M46 | Leer <i>et al.</i> (1995) |
| Divergicina A | <i>C. divergens</i> LV13 | Worobo <i>et al.</i> (1995) |

GRUPO IIb. SISTEMAS DE DOS PÉPTIDOS**IIb-NP. Bacteriocinas no del tipo pediocina****IIb-NP-sec-independientes**

| | | |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Lactococcina M (M/N) | <i>L. cremoris</i> 9B4 | Van Belkum <i>et al.</i> (1991a) |
| Lactococcina G (Ga/Gβ) | <i>L. lactis</i> LMG2081 | Havarstein <i>et al.</i> (1993) |
| Lactacina F (Fa/Fx) | <i>Lb. johnsonii</i> VPI11088 | Fremaux y Klaenhammer (1993) |
| Plantaricina S (α/β) | <i>Lb. plantarum</i> LCPO10 | Jiménez-Díaz <i>et al.</i> (1995) |
| Termofilina 13 (ThmA/B) | <i>S. thermophilus</i> SFi13 | Marciset <i>et al.</i> (1997) |
| Plantaricinas EF y JK | <i>Lb. plantarum</i> C11 | Diep <i>et al.</i> (1996) |
| | | Anderssen <i>et al.</i> (1998) |

^aEn esta clasificación se han incluido solamente bacteriocinas caracterizadas genéticamente. Las bacteriocinas con el mismo número entre paréntesis tienen idéntica secuencia aminoacídica.

transportadores ABC específicos (IIb-NP-*sec*-independientes). En base a esta clasificación, la enterocina P de *E. faecium* P13 y la enterocina B y enterocina A de *E. faecium* T136 se incluyen en los grupos IIa-P-*sec*-dependientes, IIa-NP-*sec*-independientes y IIa-P-*sec*-independientes, respectivamente.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los embutidos crudos curados españoles elaborados artesanalmente sin cultivos iniciadores constituyen una excelente fuente para el aislamiento de bacterias lácticas antagonistas del crecimiento de otros microorganismos. De 768 aislamientos procedentes de 8 embutidos diferentes se obtuvieron 46 cepas con actividad antimicrobiana en medio sólido, de las que únicamente 12 secretaron compuestos antimicrobianos difusibles en medio líquido. En base a diversas pruebas microbiológicas y bioquímicas y a sus patrones electroforéticos de proteínas totales, las 12 bacterias lácticas seleccionadas se clasificaron taxonómicamente como *Pediococcus acidilactici* A172, *P. acidilactici* X13, *P. acidilactici* P20, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* G18, *Enterococcus faecium* P13, *E. faecium* T136, *E. faecium* P21, *E. faecium*-atípico G16, *E. faecium*-atípico AA13, *Lactobacillus sake*-atípico S124, *Lb. sake*-atípico B18 y *Lb. plantarum* AA24.

SEGUNDA. Las 12 bacterias lácticas seleccionadas presentan características importantes desde un punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario, tales como carecer de actividad catalásica, no producir dióxido de carbono ni ácido sulfhídrico, desarrollarse en presencia de un 6,5% de cloruro sódico, a excepción de *L. lactis* G18, en un amplio rango de temperaturas y a bajos valores de pH, originar un marcado descenso del pH y poseer actividad bacteriocinogénica. Asimismo, ninguna de las 5 cepas del género *Enterococcus* presenta actividad hemolítica ni ureásica.

TERCERA. *E. faecium* P13 produce una bacteriocina denominada enterocina P que destaca por su potente actividad antimicrobiana frente al microorganismo patógeno productor de toxiinfecciones alimentarias *Listeria monocytogenes*. En su espectro de acción también se incluyen microorganismos alterantes, como *Ls. innocua*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp., y otras bacterias patógenas de los alimentos, como *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *B. cereus*, y *St. aureus*.

CUARTA. *E. faecium* T136 produce dos bacteriocinas denominadas enterocina B y enterocina A que presentan actividad antimicrobiana independiente, actúan sinérgicamente y muestran distinta especificidad en su acción inhibidora frente a diversos microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.

QUINTA. La purificación de la enterocina P, enterocina B y enterocina A por precipitación con sulfato amónico, cromatografía de -filtración en geles, -intercambio catiónico, -interacción hidrofóbica y -fase reversa (FPLC) constituye una metodología rápida, barata, versátil y eficaz para la purificación a homogeneidad de bacteriocinas heterogéneas bioquímicamente.

SEXTA. Las diferencias observadas en la producción de enterocina P cuando *E. faecium* P13 se desarrolló en distintos medios de cultivo y a distintas temperaturas, así como las detectadas en la producción de enterocina B y enterocina A cuando *E. faecium* T136 se desarrolló en un fermentador manteniendo el pH del medio de cultivo constante a diversos valores, sugieren la existencia de mecanismos de regulación implicados en su síntesis y excreción al medio exocelular.

SÉPTIMA. La enterocina P presenta interesantes características tecnológicas entre las que se incluyen su naturaleza proteica y su pequeño tamaño molecular, su estabilidad en un amplio rango de pHs, su marcada termorresistencia, su sensibilidad a enzimas de origen pancreático y gástrico, su estabilidad durante almacenamientos prolongados en congelación y a 4, 8 y 25°C, su resistencia a la liofilización, su acción bactericida y su amplia y potente actividad antimicrobiana incluso a bajas dosis, lo que la convierte en un candidato potencial para ser empleado como bioconservante alimentario.

OCTAVA. La composición y secuencia aminoacídica de la enterocina P de *E. faecium* P13 y de la enterocina B de *E. faecium* T136 reveló que se trata de dos nuevas bacteriocinas de la clase II, en la que se incluyen péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño molecular, termoestables, catiónicos, hidrófobos y que carecen de aminoácidos modificados posttraduccionalmente. La secuencia aminoacídica de la enterocina A producida por *E. faecium* T136 la identifica con la enterocina A de *E. faecium* CTC492. La enterocina P y la enterocina A, a diferencia de la enterocina B, contienen la secuencia consenso característica de las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina.

NOVENA. Las mayores homologías de la enterocina P de *E. faecum* P13 con otras bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina se establecen con la sakacina A de *Lb. sake* Lb706 (80,5% de identidad), carnobacteriocina BM1 de *Cb. piscicola* LV17B (74,5% de identidad), leucocina A-UAL187 de *Lc. gelidum* A-UAL187 (48,7% de identidad) y enterocina A de *E. faecium* T136 y *E. faecium* CTC492 (45,5% de identidad), lo que pone de manifiesto que no existe una correlación entre la homología en la estructura primaria de las bacteriocinas del tipo pediocina y las relaciones filogenéticas de las bacterias lácticas productoras. La enterocina B de *E. faecium* T136 presenta una identidad del 47% con la carnobacteriocina A de *Cb. piscicola* LV17A, lo que constituye la primera evidencia de una homología significativa entre bacteriocinas de la clase II que no pertenecen al grupo del tipo pediocina.

DÉCIMA. La secuenciación de un fragmento de 995 pb del ADN de *E. faecium* P13 y su posterior análisis informático reveló la presencia de tres marcos de lectura abiertos consecutivos y de la misma polaridad que corresponden al gen estructural de la enterocina P (*entP*), al gen de su hipotética proteína de inmunidad (*entiP*) y a un hipotético gen de función desconocida (*orfX*). La localización del gen de la inmunidad inmediatamente debajo del gen estructural de la enterocina P es una característica generalizada entre las bacteriocinas de la clase II de las bacterias lácticas.

UNDÉCIMA. La enterocina P se sintetiza ribosomalmente en forma de un prepropéptido de 71 aminoácidos que contiene una extensión N-terminal de 27 residuos aminoacídicos y un propéptido de 44 aminoácidos y cuyo punto de procesamiento se sitúa inmediatamente después de los residuos Val-Asp-Ala de las posiciones -1 a -3 de la extensión N-terminal.

DUODÉCIMA. El análisis de la extensión N-terminal de la enterocina P reveló que ésta presenta las características de los péptidos señal y que, por lo tanto, la enterocina P se procesa y

secreta al medio exocelular a través de la Ruta General de Secreción (GSP) o sistema *sec*-dependiente. La enterocina P es la primera bacteriocina del tipo pediocina secretada mediante la Ruta General de Secreción caracterizada bioquímica y genéticamente.

DECIMATERCERA. La identificación de secuencias repetidas directas e inversas en la región del promotor del gen estructural de la enterocina P constituye la primera evidencia de la existencia de mecanismos reguladores de la transcripción de los operones de las bacteriocinas secretadas mediante la Ruta General de Secreción.

DECIMACUARTA. El segundo marco de lectura abierto localizado inmediatamente debajo del extremo 3' del gen estructural de la enterocina P codifica una hipotética proteína de inmunidad de 88 aminoácidos, que presenta una homología con las hipotéticas proteínas de inmunidad de la bacteriocina 31, sakacina A y carnobacteriocina BM1 del 52, 47 y 44%, respectivamente. El grado de homología entre dos bacteriocinas no está siempre directamente relacionado con la similitud de sus proteínas de inmunidad correspondientes; no obstante, las proteínas de inmunidad que presentan homología significativa corresponden siempre a bacteriocinas similares (identidad del 40-50% o superior).

DECIMAQUINTA. La secuenciación de un fragmento de 352 pb del ADN de *E. faecium* T136 y su posterior análisis informático reveló la presencia de un único marco de lectura abierto correspondiente al gen estructural de la enterocina B (*entB*), seguido de un hipotético terminador *rho*-independiente de la transcripción. La ausencia del gen de la inmunidad inmediatamente debajo del gen estructural de la bacteriocina se ha descrito también para la carnobacteriocina A y sugiere que la organización genética de estos operones es diferente a la del resto de bacteriocinas de la clase II.

DECIMASEXTA. La enterocina B se sintetiza ribosomalmente en forma de un prepro péptido de 71 aminoácidos que contiene una extensión N-terminal de 18 residuos aminoacídicos y un pro péptido de 53 aminoácidos y cuyo punto de procesamiento se sitúa inmediatamente después de los dos residuos de glicina consecutivos de las posiciones -1 y -2 de la extensión N-terminal.

DECIMASÉPTIMA. El análisis de la extensión N-terminal de la enterocina B reveló que ésta presenta las características de las secuencias líder del tipo doble glicina que contienen las bacteriocinas que se procesan y secretan mediante una ruta de secreción independiente de un péptido señal o sistema *sec*-independiente, en la que intervienen transportadores ABC específicos y sus proteínas accesorias.

CAPÍTULO VII.

BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T., F. M. Rombouts, J. Hugenholtz, G. Guihard y L. Letellier (1994a). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1962-1968.
- Abee, T., T. R. Klaenhammer y L. Letellier (1994b). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1006-1013.
- Abee, T. (1995). Pore-formation bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129: 1-10.
- Acton, J. C. y R. L. Dick (1975). Improved characteristics for dry, fermented turkey sausage. *Food Product Develop.*, 9: 91-94.
- Adams, M. R. y C. J. Halls (1988). Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23: 287-292.
- Adams, M. R. y P. Marteau (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.*, 27: 262-264.
- Ahn, C. y M. E. Stiles (1990a). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 302-310.
- Ahn, C. y M. E. Stiles (1990b). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2503-2510.
- Ahn, C. y M. E. Stiles (1992). Mobilization and expression of bacteriocin plasmids from *Carnobacterium piscicola* isolated from meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 217-228.
- Allison, G., C. Fremaux, C. Ahn y T. R. Klaenhammer (1994). Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, 176: 2235-2241.
- Allison, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer (1995). Heterologous expression of the lactacin F peptide by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1371-1377.
- Allison, G. E. y T. R. Klaenhammer (1996). Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4450-4460.
- American Meat Institute (1982). En: Good Manufacturing Practices: voluntary guidelines for the production of dry fermented sausages. Wilson G. D. (ed.). Washington D. C.
- Anderson D. G. y McKay (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA

from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 549-552.

Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. Eijsink y J. Nissen-Meyer (1998). Antagonistic activity from *Lactobacillus plantarum* C11: two new two peptides bacteriocins, plantaricin E/F and J/K, and the induction factor, plantaricin A. (Manuscrito enviado).

Anónimo (1991). Lactic starter cultures. Standard of identity. International Dairy Federation Standard n° 149.

Archival, F. S. e I. Fridovich (1981). Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 146: 928-936.

Arihara, K., S. Ogihara, J. Sakata, M. Itoh y Y. Kondo (1991). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecalis* against *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13: 190-192.

Arihara, K., S. Ogihara, J. Sakata, M. Itoh y Y. Kondo (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 19: 123-134.

Atrih, A., J. B. Rekhif, M. Michel y G. Lefebvre (1993). Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios*, 75: 117-123.

Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. J. Dobrogosz y S. Lindgren (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2: 131-136.

Axelsson, L. T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*, pp. 1-65. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

Axelsson, L., A. Holck, S. E. Birekland, T. Aukrust y H. Bloom (1993). Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* LB706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2868-2875.

Axelsson, L. y A. Holck (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, 177: 2125-2137.

Aymerich, T. (1996). Caracterización bioquímica y genética de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos fermentado-curados. Técnicas de transferencia genética. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

Aymerich, T., H. Holo, L. S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga e I. F. Nes (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1676-1682.

- Bacus, J. N. y W. L. Brown (1981). Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.*, 35: 74-78.
- Bacus, J. N. (1984). Update: meat fermentation 1984. *Food Technol.*, 38: 59-63.
- Bacus, J. N. y W. L. Brown (1985). The Pediococci: meat products. En: Bacterial Starters Cultures for Foods, pp. 85-96. Gilliland, S. E. (ed.). CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- Bacus, J. (1986). En: Utilization of Microorganisms in Meat Processing, pp: 170. Research Studies Press Ltd. Letchworth, Hertfordshire, Inglaterra.
- Baird-Parker, A. C. (1980). Organic acids. En: Microbial Ecology of Foods, pp. 126-135. Silliker, J. H. (ed.). Academic Press, Nueva York.
- Baird-Parker, A. C y T. Mayes (1991). Control by the application HACCP. En: Proceedings of the International Conference on *Listeria* and Food Safety. Laval, Francia.
- Balaban, N. y R. P. Novick (1995). Autocrine regulation of toxins synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 1619-1623.
- Barefoot, S. F. y T. R. Klaenhammer (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 1808-1815.
- Barefoot, S. F. y T. R. Klaenhammer (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26: 328-334.
- Barefoot, S. F., Y. R. Chen, T. A. Hughes, A. B. Bodine, M. Y. Shearer y M. D. Hughes (1994). Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3522-3528.
- Battistotti, B., V. Bottazzi y G. Vola (1977). Impiego of *Streptococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e bacilli lattici nella caseificazione del formaggio Fontina. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 28: 331-341.
- Beck-Sickinger, A. G. y G. Jung (1991). Synthesis and conformational analysis of lantibiotic leader-, pro- and pre-peptides. En: Nisin and Novel Antibiotics, pp. 218-230. Jung, G. y H. G. Sahl (eds.). ESCOM Publishers, Leiden, Países Bajos.
- Ben Embarek, P. K., V. From Jeppesen y H. H. Hus (1994). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from sous-vide cooked fish fillets. *Food Microbiol.*, 11: 525-536.
- Berdagué, J. L., C. Montel, R. Talon y P. Montel (1992). Influence of starter cultures on the volatile content and aroma of dry sausage. *Proc. 38th Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, pp. 771-774. Clermont-Ferrand, Francia.

- Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser y A. Servin (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultural human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35: 483-489.
- Bhugaloo-Vial, P., X. Dousset, A. Metivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval y D. Marion (1996). Purification and amino acid sequences of piscicocins VIa y VIb, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4410-4416.
- Bhunja, A. K., M. G. Johnson y B. Ray (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Industrial Microbiol.*, 2: 319-322.
- Bhunja, A. K., M. C. Johnson y B. Ray (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
- Bhunja, A. K., M. C. Johnson, B. Ray y N. Kalchayanand (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 1-9.
- Bibel, D. J. (1988). Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News.*, 54: 661-665.
- Bierbaum, G. y H. G. Sahl (1991). Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep 5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. En: *Nisin and Novel Lantibiotics*, pp. 386-396. G. Jung y H. G. Sahl (eds.). ESCOM Publishers, Leiden, Países Bajos.
- Birnboim, H. C. y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- Biswas, S. R., R. Purbita, M. C. Johnson y B. Ray (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1265-1267.
- Björck, L. (1985). The lactoperoxidase system. En: *Natural Antimicrobial Systems*, pp. 18-30. IDF., Bruselas.
- Blocher, J. C. y F. F. Busta (1983). Bacterial spore resistance to acids. *Food Technol.*, 37: 87-99.
- Bolton E. T. y McCarthy (1962). A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 48: 1390.
- Booth, I. R. y R. G. Kroll (1989). The preservation of food by low pH. En: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, pp. 119-160. Gould, G. W. (ed.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres.

- Bourret, R. B., K. A. Borkovich y M. I. Simon (1991). Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 401-441.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-251.
- Bridge, P. D. y P. H. A. Sneath (1982). Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *J. Gen. Microbiol.*, 114: 27-33.
- Brock, T. D., B. Peacher y D. Pierson (1963). Survey of the bacteriocins of enterococci. *J. Bacteriol.*, 86: 702-707.
- Bruno, M. E. C. y T. J. Montville (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3003-3010.
- Brurberg, M. B., I. F. Nes y V. G. H. Eijsink. (1997). Pheromone-induced production of antimicrobials peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.*, 26: 347-360.
- Buckenhuskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 253-272.
- Buchanan, R. L. y N. E. Gibbons (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Bukhtiyarova, M., Y. Rongguang y B. Ray (1994). Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3405-3408.
- Bycroft, B. W., W. C. Chan y G. C. K. Roberts (1991). Synthesis and characterization of pro- and pre- peptides related to nisin and subtilisin. En: *Nisin and Novel Antibiotics*, pp. 204-217. Jung, G. y H. G. Sahl (eds.). ESCOM Publishers, Leiden, Países Bajos.
- Carlsson, J., Y. Iwami y T. Yamada (1983). Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effects on lactoperoxidase-thiocyanate peroxide. *Infect. Immun.*, 40: 70-80.
- Carolissen-MacKay, V., G. Arendse y J. W. Hastings (1997). Purification of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16.
- Casas, I., A. Shornikova, E. Isolauri, S. Salminen y T. Vesikari (1996). Colonization of *Lactobacillus reuteri* in the gastrointestinal tract of children. *Abstr. SOMED Meet.*, Puerto Rico.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294.

- CDC. 1979. Staphylococcal food poisoning associated with italian dry salami. *Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report*, 28: 179-180.
- Cintas, L. M., P. Casaus, J. M. Rodríguez, W. Moreira, O. J. Sobrino, M. F. Fernández y P.E. Hernández (1993). Further isolation and biochemical characterization of bacteriocins of lactic acid bacteria from meat origin. *Abstr. 3th Meet. Contr. BRIDGE T-Project Biotechnol. LAB.* p.57. Atenas, Grecia.
- Cintas, L. M. (1995). Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo (1995). Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández and P. E. Hernández (1998a). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, (Manuscrito en prensa).
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Havarstein (1998b). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, (Manuscrito en prensa).
- Clark, J. M. (1988). Novel non-template nucleotide addition reactions catalyzed by procariotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids. Res.*, 16: 9677-9680.
- Cogan, J. F., D. Walsh y S. Condon (1989). Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 77-84.
- Collins, M. D., J. A. Farrow, J. A. E. Phillips y B. A. Kandler (1983a). *Streptococcus garviae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3427-3431.
- Collins, M. D., D. Jones, J. A. E. Farrow, R. Kilpper-Bälz y K. H. Schleifer (1984a). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* nom. rev., comb. nov., and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 220-223.
- Collins, M. D., J. A. E. Farrow y D. Jones (1986a). *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 8-12.
- Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu y D. Jones (1987a). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogeneous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37:

310-316.

Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks y A. M. Williams (1989a). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 453-460.

Collins, M. D., R. R. Facklam, J. A. E. Farrow y R. Williamson (1989b). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 283-288.

Collins, M. D., A. M. Williams y S. Wallbanks (1990a). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 70: 255-262.

Collins, M. D., U. M. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martínez-Murcia, B. A. Philips, A. M. Williams y S. Wallbanks (1991a). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77: 5-12.

Collins, M. D., U. M. Rodrigues, N. E. Piggot y R. R. Facklam (1991b). *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 95-98.

Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Wallbanks (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 595-603.

Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 269-280.

Contreras, B. G. L., L. De Vuyst, B. Devreese, K. Busanyova, J. Raymaeckers, F. Bosman, E. Sablon y E. J. Vandamme (1997). Isolation, purification and characterization of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 13-20.

Cooke, R. D., D. R. Twiddy y P. J. A. Alan Reilly (1987). Lactic-acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 369-379.

Cornwell, G. G., K. Sletten, B. Johansson y P. Westermark (1988). Evidence that the amyloid fibril protein in senile systemic amyloidosis is derived from normal prealbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154 : 648-653.

Chen, Y., R. Shapira, M. Eisenstein y T. J. Montville. (1997). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a

predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 524-531.

Chikindas, M. L., M. J. García-Garcerá, A. J. M. Driessen, A. M. Ledeboer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings y G. Venema (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3577-3584.

Chung, T. C., L. Axelsson, S. E. Lindgren y W. J. Dobrogosz (1989). *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2: 137-144.

Daba, H., C. Lacroix, J. Huang y R. E. Simard (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesentericin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 166-173.

Daba, H., C. Lacroix, J. Huang, R. E. Simard y L. Lemieux (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 682-688.

Daeschel, M. A. y T. R. Klaenhammer (1985). Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1538-1541.

Daeschel, M. A., R. E. Andersson y H. P. Fleming (1987). Microbial ecology of fermented plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 357-367.

Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43: 164-167.

Daeschel, M. A., M. C. McKenney y L. C. McDonald (1990). Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.*, 7: 91-98.

Daeschel, M. A. (1992). Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Food Biopreservatives of Microbial Origin, pp. 323-345. Ray, B. y M. Daeschel (eds.). CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.

Davey, G. P. (1981). Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. *J. Dairy Sci. Technol.*, 16: 187-190.

Davey, G. P. y B. C. Richardson (1981). Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Microbiol.*, 41: 84-89.

Davey, G. P. (1994). Diplococcin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 273-290. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.

Davidson, P. M. y M. E. Parish (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials.

Food Technol., 50: 148-155.

Deibel, R. H., C. F. Niven y G. D. Wilson (1961). Microbiology of meat curing III. Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sausages. *Appl. Microbiol.*, 9: 156-161.

Deibel, R. H. (1964). The group D streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 28: 330-366.

De Klerk, H. C. y J. N. Coetze (1961). Antibiosis among lactobacilli. *Nature*, 192: 340-341.

De Klerk, H. C. (1967). Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. *Nature*, 214: 609.

De Klerk, H. C. y J. A. Smit (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *J. Gen. Microbiol.*, 48: 309-316.

De Man, J. C., M. Rogosa y M. E. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as food preservative. *Food Technol.*, 44: 100-117.

De Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, M. M. Beerthuyzen, I. Van Alen-Boerrigter y W. M. De Vos (1996). Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178: 3434-3439.

Devriese, L. A., A. Van De Kerckhove, R. Kilpper-Bälz y K. H. Schleifer (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 257-259.

Devriese, L. A., K. Ceyssens, U. M. Rodrigues y M. D. Collins (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol. Lett.*, 71: 247-252.

Devriese, L. A., M. D. Collins y R. Wirth (1992). The genus *Enterococcus*. En: *The Prokaryotes. A Hand Book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*, vol. 2, pp. 1465-11481. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer (eds.). Springer-Verlag, Nueva York.

Devriese, L. A., B. Pot y M. D. Collins (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 399-408.

Devriese, L. A. y B. Pot (1995). The genus *Enterococcus*. En: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2, pp. 327-367. Wood, B. J. B. y W. H. Holzapel (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.

- Devriese, L. A., B. Pot, L. V. Damme, K. Kesters y F. Haesebrouck (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from animal origin. *Food Microbiol.*, 26: 187-197.
- De Vos, W. M., J. W. M. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz y O. P. Kuipers (1993). Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 213-218.
- De Vos, W. M. y G. Simons (1994). Gene cloning and expression systems in lactococci. En: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, pp. 52-105. Gasson, M. J. y W. M. De Vos (eds.). Chapman & Hall, Glasgow.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 571-578.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (1994a). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (1994b). Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 91-143. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (1994c). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 151-221. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- De Vuyst, L. (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NIZO22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 28-33.
- De Vuyst, L., R. Callewaert y K. Crabbé (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142: 817-827.
- Dicks, L. M. T., D. E. Van Jaarsveld y H. J. J. Van Vuuren (1992). Caseicin LHS, a broad spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus casei*. *Abstr. 7th Biennal Congr. South African Soc. Microbiol.*, pp. 214.
- Dicks, L. M. T., F. Dellaglio y M. D. Collins (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 347-351.
- Diep, D. B., L. S. Havarstein, J. Nissen-Meyer e I. F. Nes (1994). The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an *agr*-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 160-166.

- Diep, D. B., L. S. Havarstein e I. F. Nes (1995). A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.*, 18: 631-639.
- Diep, D. B. (1996). Regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. Tesis Doctoral. Universidad Agrícola de Noruega, Aas, Noruega.
- Diep, B. D., L. S. Havarstein e I. F. Nes (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178: 4472-4483.
- Dierick, N., P. Vanderkerckhove y D. Demeyer (1974). Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *J. Food Sci.*, 39: 301-304.
- Dodd, H. M., N. Horn y M. J. Gasson (1990). Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 555-566.
- Dodd, H. M. y M. J. Gasson (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, pp. 211-251. Gasson, M. J. y W. M. De Vos (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- Doyle, M. P. (1988). *Bacillus cereus*. *Food Technol.*, 4: 181-200.
- Driessen, A. J. M., H. W. Van Den Hooven, W. Kuiper, M. Van De Kamp, H. G. Sahl, R. N. H. Konings y W. N. Konings (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34: 1606-1614.
- Dufour, A., D. Thuault, A. Boulliou, C. M. Bourgeois y J. P. Le Pennec (1991). Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2423-2429.
- Egan, A. F. y T. A. Roberts (1987). Microbiology of meat and meat products. En: Assays in Agricultural and Food Microbiology, pp. 167-196. Norris, J. R. y G. L. Pettipher (eds.). John Wiley & Sons, Nueva York.
- Eijsink, V. G. H., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven e I. F. Nes (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, 178: 2232-2237.
- Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy y R. Wall (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic membrane plot. *J. Mol. Biol.*, 179: 125-142.
- Eitenmiller, R. R., P. E. Koehler y J. O. Reagan (1978). Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. *J. Food Sci.*, 43: 689-693.
- Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.*, 137: 2423-2429.

- Elegado, F. B., W. J. Kim y D. Y. Kwon (1997). Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.*, 37: 1-11.
- Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelmann y K. D. Entian (1992). Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the Nis B protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3730-3743.
- Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, P. Kiesau, K. Siegers, M. Hammelmann y K. D. Entian (1994). Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 814-825.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, F. Bringel, J. C. Hubert y C. Hasselmann (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4381-4387.
- Evans, J. B. (1986). Genus *Aerococcus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1080. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Facklam, R. R. y M. D. Collins (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 731-734.
- Faith, M. J., R. Skvirsky, L. Gilson, H. K. Mahanty y R. Kolter (1992). The secretion of colicin V. En: Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics, pp. 331-348. James, R., C. Lazdunski y F. Pattus (eds.). Springer-Verlag, Nueva York.
- Farber, J. M. y P. I. Peterkin (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55: 476-511.
- Farías, M. E., R. N. Farías, A. P. de Ruíz Holgado y F. Sesma (1996). Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a "pediocin-like" bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 417-419.
- Farrow, J. A. E. y M. D. Collins (1985). *Enterococcus hirae* a new species that includes amino acid assay strain NCDP 1285 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 73-75.
- Fath, M. J. y R. Kolter (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, 57: 995-1017.
- Felix, J. V., M. A. Papathanasopoulos, A. A. Smith, A. Von Holy y J. W. Hastings (1994). Characterisation of Leucocin B-Talla: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Talla isolated from meat. *Current Microbiol.*, 29: 207-212.

- Fernandes, C. F., K. M. Shahani y M. A. Amer (1987). Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli in fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 343-356.
- Fernandes, C. F., y K. M. Shahani (1990). Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Prot.*, 53: 704-710.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3313-3318.
- Finegold, S. M., H. R. Attebery y V. L. Slutter (1974). Effect of diet on human faecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutrition*, 27: 1456-1469.
- Fleming, H. P., J. L. Etchells y R. N. Costilow (1975). Microbial inhibition of an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.*, 30: 1040-1042.
- Fleming, H. P. y R. F. McFeeters (1981). Use of microbial cultures: vegetable products. *Food Technol.*, 35: 84-88.
- Flores, J. (1994). Estado actual y perspectivas del curado de productos cárnicos. *AICE*, 47: 6-7.
- Flores, J. (1995). Importancia de la tecnología en la calidad de los embutidos crudos curados. III. Operación de estufaje. *AICE*, 48: 5-8.
- Food and Drug Administration (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Reg.*, 53: 11247-11250.
- Fornaud, J. (1976). La microbiologie du saucisson sec. *L'alimentation et la vie*, 64: 82-92.
- Franke, C. M., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, J. Kok, G. Venema y K. Venema (1996). Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178: 1766-1769.
- Franz, C. M., U. Schillinger y W. H. Holzapfel (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 255-270.
- Franz-mann, P. D., P. Höpfl, N. Weiss y B. J. Tindall (1991). Psychrotrophic, lactic acid producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *C. funditum* sp. nov. and *C. alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 156: 255-262.
- Frazier, W. C. y D. C. Westhoff (1985). Infecciones e intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano. En: Microbiología de los Alimentos, pp. 413-446. McGraw-Hill Book Co., Nueva York.

- Fredericq, P. (1946). Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des Staphylocoques. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 140: 1167-1170.
- Fredericq, P. (1948). Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.*, 19: 1-107.
- Fremaux, C., C. Ahn y T. R. Klaenhammer (1993). Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3906-3915.
- Fremaux, C. y T. R. Klaenhammer (1993). Helveticin J, a large heat-labile bacteriocin from *Lactobacillus helveticus*. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, pp. 397-418. De Vuyst, L. y Vandamme, E. J. (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- Fremaux, C., Y. Héchard y Y. Cenatiempo (1995). Mesentericin Y105 gene cluster in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, 141: 1637-1645.
- Freund, S. y G. Jung (1992). Lantibiotics: An overview and conformational studies on gallidermin and Pep5. En: Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics, pp. 75-92. James, R., C. Lazdunski y F. Pattus (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Frey, W. (1983). En: Fabricación fresca de embutidos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.
- Fujisawa, T., Y. Benno, T. Yaeshima y T. Mitsuoka (1992). Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson *et al.*, 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 487-491.
- Gálvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada y E. Montoya (1986). Characterization and partial purification of a broad antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 32: 765-771.
- Gao, F. H., T. Abee y W. N. Konings (1991). Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2164-2170.
- García-Garcera, M. J., M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen y W. N. Konings (1993). *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, 212: 417-422.
- Garver, K. I. y P. M. Muriana (1993). Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.*, 19: 241-258.

- Garver, K. I. y P. M. Muriana (1994). Purification and partial aminoacid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2191-2195.
- Garvie, E. I. y J. A. E. Farrow (1981). Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zentralbl. Bakteriol. I Abt. Orig.*, C 2: 299-310.
- Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc* y genus *Pediococcus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1071-1079. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Garriga, M., M. Hugas, M. J. Gispert y C. Sarraga (1993a). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* CTC 492 isolated from fermented sausages. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 131.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich y J. M. Monfort (1993b). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 142-148.
- Geis, A., J. Singh y M. Teuber (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 205-211.
- Genigeorgis, C. A. (1976). Quality control for fermented meats. *J. Am. Vet. Med.*, 13: 333-340.
- Gierasch, L. M. (1989). Signal sequences. *Biochemistry*, 28: 923-930.
- Gilson, L., H. K. Mahanty y R. Kolter (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export and immunity. *J. Bacteriol.*, 169: 2466-2470.
- Gilson, L., H. K. Mahanty y R. Kolter (1990). Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.*, 9: 3875-3884.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 175-188.
- Gilliland, S. E. y M. C. Speck (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and food-borne pathogens in associative culture. *J. Food Prot.*, 40: 820-823.
- Giraffa, G., E. Neviani y G. T. Tarelli (1994). Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an italian soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 77: 1176-1182.
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potencial as anti-*Listeria* in dairy technology. *Food Microbiol.*, 12: 291-299.

- Giraffa, G., N. Picchioni, E. Neviani y D. Carminati (1995). Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheese making and ripening. *Food Microbiol.*, 12: 301-307.
- Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, suppl. 82-86.
- González, C. F. y B. S. Kunka (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2534-2538.
- González, B., P. Arca, B. Mayo y J. E. Suárez (1994). Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2158-2163.
- Gratia, A. (1946). Techniques selectives pour la recherche systematique des germes antibiotiques. *C. R. Seances Soc. Biol. París*, 140: 1053-1055.
- Graves, M. C. y J. C. Rabinowitz (1986). *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene, Evidence for "extended" promoter elements in gram-positive organisms. *J. Biol. Chem.*, 261:11409-11415.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 93: 1040-1041.
- Gross, E. (1977). Chemistry and biology of amino acids in food proteins. En: Food Proteins. Improvement through chemical and enzymatic modification, pp. 37-51. Feeney, R. E. y J. R. Whitaker (eds.). American Chemical Society, Washington, DC.
- Gupta, R. K. y V. K. Batish (1992). Genetic evidence for plasmid-encoded lactococcin production in *Lactococcus lactis* 484. *Current Microbiol.*, 24: 231-238.
- Gurr, M. I. (1987). Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46: 337-342.
- Hager, P. W. y J. C. Rabinowitz (1985). Translational specificity in *Bacillus subtilis*. En: The Molecular Biology of the Bacilli, vol. III, pp. 1-3. D. A. Dubnao (ed.). Academic Press, Inc., Orlando.
- Hammes, P. W., A. Bantleon y S. Min (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 165-174.
- Hammes, W. P., N. Weiss y W. P. Holzapfel (1992). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The Prokaryotes. A Hand Book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, vol. 2, pp. 1535-1594. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer (eds.). Springer-Verlag, Nueva York.

- Hammonds, S. J., T. J. Easterbrook y M. B. III McMurray (1991). Differentiation of enterococci from other group D streptococci by means of a specific monoclonal antibody. *FEMS Microbiol. Lett.*, 82: 91-104.
- Hardie, J. M. (1986). Genus *Streptococcus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1043-1070. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Hardy, K. G. (1975). Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, 39: 464-515.
- Hartlein, M., S. Schiessl, W. Wagner, U. Rdest, J. Kreft y W. Goebel (1983). Transport of haemolysin by *E. coli*. *J. Cell Biochem.*, 22: 87-89.
- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC19115, ScottA, and UAL500 to nisin. *J. Food Prot.*, 54: 83-840.
- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer (1992). Developments in nisin research. *Food Res. Int.*, 25: 57-66.
- Hastings, J. W. y M. E. Stiles (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 127-134.
- Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1991). Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 173: 7491-7500.
- Havarstein, L. S., J. Nissen-Meyer e I. F. Nes (1993). Characterization of the genes involved in production and secretion of lactococcin G, a bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: P142.
- Havarstein, L. S., H. Holo e I. F. Nes (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140: 2383-2389.
- Havarstein, L. S., D. B. Diep e I. F. Nes (1995a). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16: 229-240.
- Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy y D. A. Morrison (1995b). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 92: 11140-11144.
- Hawley, D. K. y W. R. McClure (1983). Compilation an analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.*, 11: 2237-2255.

- Haymon, L. W. (1982). Fermented sausages. En: Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, pp. 237-245. Reed, G. (ed.). AVI Publishing Co., Inc., Westport, Connecticut.
- Héchar, Y., B. Derijard, F. Letellier y Y. Cenatiempo (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2725-2731.
- Helling, R. B., H. M. Goodman y H. W. Boyer (1974). Analysis of R *EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, 14: 1235-1244.
- Henderson, J. T., A. L. Chopko y P. D. Van Wassenaar (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295: 5-12.
- Herbert, J. B. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 253-272.
- Hernández, P. E., J. M. Rodríguez, L. M. Cintas, W. L. Moreira, O. J. Sobrino, M. F. Fernández y B. Sanz (1993). Utilización de las bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiol. SEM*, 9: 37-43.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8: 67-113.
- Hirsch, A. y E. Grinstead (1951). The differentiation of the lactic streptococci and their antibiotics. *J. Dairy Res.*, 18: 198-204.
- Hjertén, S. (1973). Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatog.*, 87: 325-331.
- Hjertén, S. (1976). Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents. En: *Methods of Protein Separation*, vol. 2, pp. 708-734. Catsimpoolas, N. (ed.). Plenum Publishing Corp., Nueva York.
- Hjertén, S. (1977). Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins. *Proc. Int. Workshop Technol.*, pp. 410-421. Reston, Virginia.
- Hoch, J. A. y T. J. Silhavy (1995). Two-component signal transduction. *ASM Press.*, Washington, D. C.
- Holck, A. L., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust y H. Blom (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2715-2720.

- Holck, A., L. Axelsson, S. K. Hühne y L. Kröckel (1994a). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.*, 115: 143-150.
- Holck, A. L., L. Axelsson y U. Schillinger (1994b). Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiol.*, 29: 63-68.
- Holo, H., O. Nissen e I. F. Nes (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.
- Holt, J. H., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Hoover, D. G. (1993). Bacteriocins with potencial for use in foods. En: Antimicrobials in Foods, pp. 409-441. Davidson, P. M. y A. L. Branen (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Horn, N., S. Swindell, H. M. Dodd y M. J. Gasson (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.*, 228: 129-135.
- Hosoda, M., H. Hashimoto, H. Morita y M. Chiba (1992). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine. *J. Dairy Sci.*, 75: 976-981.
- Hugas, M., M. Garriga, T. Aymerich y J. M. Monfort (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food. Microbiol.*, 18: 107-113.
- Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich y J. M. Monfort (1995). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 322-330.
- Hueppe, F. (1884). Milchsäurebacillus syn. Bacterium Acidi Lactici. *Zepf. Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt*, 2: 337-340.
- Hughes, M. D. y S. F. Barefoot (1990). Activity of the bacteriocin lactacin B is enhanced during associative growth of *Lactobacillus acidophilus* N2 and *Lactobacillus leichmanii* 4797. *Abstr. Annu. Meet. ASM*, pp. 13-17. Anaheim, California.
- Hühne, K., L. Axelson, A. Holck y L. Kröckel (1996). Analysis of sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* LB674 and its expression in sakacin P negative *Lb. sake* strains. *Microbiology*, 142: 1437-1448.
- Hui, F. M., L. Zhou y D. A. Morrison (1995). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcin A secretion genes. *Gene*, 153: 25-31.

- Huo, L., K. J. Martin y R. Schleif (1988). Alternative loops regulate the arabinose operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 5444-5448.
- Hurst, A. (1981). Nisin. En: *Advances in Applied Microbiology*, pp. 85-123. Perlman, D. y A. I. Laskin (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York.
- Hyde, S. C., P. Emsley, M. J. Hartshorn, M. M. Mimmack, U. Gileadi, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, D. R. Gill, R. E. Hubbard y C. F. Higgins (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346: 362-365.
- Hynes, W., J. J. Ferreti y J. R. Tagg (1993). Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes* and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1969-1971.
- Immonen, T., S. Ye, R. Ra, M. Qiao, L. Paulin y P. E. J. Saris (1995). The codon usage of the *nisZ* operon in *Lactococcus lactis* N8 suggests a non-lactococcal origin of the conjugative nisin-sucrose transposon. *DNA Sequence*, 5: 203-218.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.
- Itakura, K., J. J. Rossi y R. B. Wallace (1984). Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 323.
- Izard, J. W. y D. A. Kendall (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.*, 13: 765-773.
- Jack, R. W., A. Carne, J. Metzger, S. Stefanovic, H. G. Sahl, G. Jung y J. R. Tagg (1994). Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur. J. Biochem.*, 220: 455-462.
- Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.
- Jack, R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. H. Wettenhall, M. W. Hickey y M. J. Coventry (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2897-2903.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch y E. Wollman (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 84: 222-224.
- Jacobsen, H., H. Klenow y K. Overgaard-Hansen (1974). The N-terminal amino-acids sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments

obtained by a limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, 45: 623-627.

Janzon, L., S. Lofdhal y S. Arvidson (1989). Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.*, 219: 480-485.

Jay, J. M. (1982a). Effect of diacetyl on foodborne microorganisms. *J. Food Sci.*, 47:1831-1836.

Jay, J. M. (1982b). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 525-531.

Jay, J. M. (1986). Modern food Microbiology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.

Jay, J. M., G. M. Rivers y W. E. Boisvert (1983). Antimicrobial properties of α -dicarbonyl and related compounds. *J. Food Prot.*, 46: 325-330.

Jiménez-Díaz, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba y J. C. Piard (1993). Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1416-1424.

Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4459-4463.

Joosten, H. M. L. J., M. Nuñez, B. Devreese, J. V. Beeumen y J. D. Marugg (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4220-4223.

Joerger, C. y T. R. Klaenhammer (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, 167: 439-446.

Joerger, C. y T. R. Klaenhammer (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J. Bacteriol.*, 171: 6339-6347.

Jones, D. (1978). Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. En: Streptococci, pp. 1-49. F. A. Skinner y L. B. Quesnel (eds.). Academic Press, Inc., Londres.

Jones, D. (1986). Genus *Erysipelothrix*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1245-1249. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

- Joyce, C. M. y N. D. F. B Grindley (1983). Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 80: 1830-1834.
- Kagermeier-Callaway, A. S. y E. Lauer (1995). *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 is the senior synonym for *Lactobacillus bavaricus* Stetter and Stetter 1980. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 398-399.
- Kaiser, A. L. y T. J. Montville (1993). The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 536-540.
- Kaiser, A. L. y T. J. Montville (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4529-4535.
- Kalchayanand, N., M. B. Hanilin y B. Ray (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 239-243.
- Kalina, A. P. (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 185-189.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 49: 209-224.
- Kandler, O. y N. Weiss (1986). Genus *Lactobacillus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1208-1234. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Kanatani, K., M. Oshimura, y K. Sano (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1061-1067.
- Kato, K., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato y R. Nakamura (1993). Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 551-556.
- Kaukas, A., M. Hinton y A. H. Linton (1986). Changes in the faecal enterococcal population of young chickens and its effect on the incidence of resistant to certain antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2: 5-8.
- Kékessy, D. A. y J. D. Piguet (1970). New method for detection bacteriocin production. *Appl. Microbiol.*, 20: 282-283.

- Kelly, W. J., R. V. Asmundson y C. M. Huang (1996). Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 209-218.
- Kerstens, K. y J. De Ley (1975). Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 87: 333-342.
- Kilpper-Bälz, R. y K. H. Schleifer (1981). DNA-rRNA hybridization studies among staphylococci and some other Gram positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 19: 357-362.
- Kilpper-Bälz, R., G. Fischer y K. H. Schleifer (1982). Nucleic acid hybridization of group N and D streptococci. *Current Microbiol.*, 7: 245-250.
- Kilpper-Bälz, R. y K. H. Schleifer (1984). Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, 24: 355-364.
- Kjems, E. (1955). Studies on streptococcal bacteriophages. I. Techniques of isolating phage producing strains. *Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 433-440.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.
- Kleerebezem, M., L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers y W. M. de Vos (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24: 895-904.
- Klein, P., M. Kanehisa y C. Delisi (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 815: 468-476.
- Koivula, T., M. Sibakov e I. Palva (1991). Isolation and characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 333-340.
- Kong, S. y A. J. Davison (1980). The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , OH, e^- and O_2 in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, 204: 13-29.
- Konisky, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36: 125-144.
- Kordel, M., F. Schuller y H. G. Sahl (1989). Interaction of the pore-forming peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. *FEMS Lett.*, 244: 99-102.
- Kozak, W., J. Bardowski y W. T. Dobrzanski (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic acid streptococci. *J. Dairy Res.*, 45: 247-257.

- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.*, 47: 1-45.
- Kramer, J. y H. Brandis (1975). Purification and characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *J. Gen. Microbiol.*, 88: 93-100.
- Kramer, J., J. Kennes y H. Brandis (1983). Transfer of a miniplasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *Streptococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 20: 385-389.
- Kuhnen, E., H. G. Sahl y H. Brandis (1985). Purification and properties of LIQ 4, an antibacterial substance produced by *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* K4. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1925-1932.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. De Ruyter, E. J. Luesink y W. M. De Vos (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270: 27299-27304.
- Kulshrestha, D. C. y E. H. Marth (1974a). Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. III. *Staphylococcus aureus*. *J. Milk Food Technol.*, 37: 545-550.
- Kulshrestha, D. C. y E. H. Marth (1974b). Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. II. *Salmonella typhimurium*. *J. Milk Food Technol.*, 37: 539-544.
- Kulshrestha, D. C. y E. H. Marth (1974c). Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J. Milk Food Technol.*, 37: 510-516.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C. R. Banner y J. L. Fryer (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 406-409.
- Kyte, J. y R. F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Langner, H. (1972). Aromastoffe in der Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 52: 1299.
- Larsen, A. G., F. K. Vogensen y J. Josephsen (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 113-122.

- Larsen, A. G. y B. Norrung (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17: 132-134.
- Lauková, A., M. Mareková y P. Javorsky (1993). Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16:257-260.
- Lazdunski, C. J., D. Baty, V. Geli, D. Cavard, J. Morlon, R. Lloubes, S. P. Howard, M. Knibiehler, M. Chartier, S. Varenne, M. Frenette, J. L. Dasseux y F. Pattus (1988). The membrane channel-forming colicin A: synthesis, secretion, structure, action and immunity. *Biochim. Biophys. Acta*, 947: 445-464.
- Le Blanc, D. J., V. L. Crow y L. L. Lee (1980). Plasmid mediated carbohydrate enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. En: *Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanisms*, pp. 31-41. C. Stuttard y K. R. Rozee (eds.). Academic Press, Nueva York.
- Lee, Y-K. y S. Salminen (1995). The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 6: 241-245.
- Leer, J. R., J. M. B. M. Van Der Vosse, M. Van Gieze, J. M. Van Noort y P. H. Pouwels (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, 141: 1629-1635.
- León, J. y J. M. García (1992). Expresión genética y su control en procariotas. En: *Manual de Genética Molecular*, pp. 107-134. J. León y J. M. García (eds.). Ed. Síntesis, S. A., Madrid.
- Lepoutre, A., C. Moyse, C. Roure, J. Rocourt, V. Goulet y A. L. Courtieu (1992). Épidémie de listérioses en France. *Bulletin Épidémiology Hebdom*, 38: 115.
- Lerche, M. y G. Reuter (1962). Das Vorkommen aerobwachsender Gram-positiver stabchen de genus *Lactobacillus* beijerinck imm darminhalt erwachsener menschen. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig.*, 185: 446-481.
- Lewus, C. B., A. Kaiser y T. J. Montville (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1683-1688.
- Lewus, C. B., S. Sun y T. J. Montville (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 143-149.
- Liepe, H. U. (1983). Starter cultures in meat production. En: *Biotechnology*, pp. 399-424. Rehm, H. J. y G. Reed (eds.). Verlag Chemie, Weilheim, Alemania.
- Lindgren, S., K. Petterson, A. Jonsson, P. Lingvall y A. Kaspersson (1985). Silage

inoculation. *Swedish J. Agric. Res.*, 15: 9-18.

Lindgren, S. E. y W. J. Dobrogosz (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 149-164.

Linton, A. H. (1983). Theory of antibiotic inhibition zone formation, disc sensitivity methods and MIC determinations. En: *Antibiotics, Assessments of Antimicrobial Activity and Resistance*, pp. 19-30. A. D. Denver y L. B. Quesnel (eds.). Academic Press, Inc., Londres.

London, J. y M. D. Appleman (1962). Oxidative and glycerol metabolism of two species of enterococci. *J. Bacteriol.*, 84: 597-598.

London, J. (1990). Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 103-112.

López-Lara, I., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda y E. Valdivia (1991). Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.*, 37: 769-774.

Lücke, F. K. (1987). Procesos microbiológicos en la elaboración de embutidos secos y jamones crudos. *Fleischwirtschaft*, 2: 39-46.

Lücke, F. K. y H. Hechelmann (1987). Starters cultures for dry sausages and raw ham. *Fleischwirtschaft*, 67: 307-314.

Maftah, A., D. Renault, C. Vignoles, Y. Héchard, P. Bressolier, M. H. Ratinaud, Y. Cenatiempo y R. Julien (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by bacteriocin mesentericin Y105. *J. Bacteriol.*, 175: 3232-3235.

Maisnier-Patin, S., E. Forni y J. Richard (1996). Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 30: 255-270.

Marciset, O. y B. Mollet (1993). Characterization of thermophilin 13, a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* Sfi13. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 129, 625.

Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet y B. Poolman (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 14277-14284.

Martin, J. D. y J. O. Mundt (1972). Enterococci in insects. *Appl. Microbiol.*, 24: 575-580.

Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. Van Beeumen, J. Coyette y E. Valdivia (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.*, 176: 6334-6339.

- Martínez-Murcia, B. A. y M. D. Collins (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 70: 73-84.
- Martínez-Murcia, A. J. y M. D. Collins (1991a). A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 82: 55-60.
- Martínez-Murcia, B. A. y M. D. Collins (1991b). *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 80: 69-74.
- Marugg, J. D., C. F. González, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenberg (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2360-2367.
- Mattick, A. T. R. y A. Hirsch (1947). Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2: 5-7.
- Maxam A. M. y W. Gilbert (1977). A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 560-564.
- Mayr-Harting, A., A. J. Hedges y R. C. W. Berkeley (1972). Methods for studying bacteriocins. En: *Methods in Microbiology*, pp. 315-422. Bergen, T. y J. R. Norris (eds.). Academic Press, Inc., Londres.
- McCormick, J. K., R. W. Worobo y M. Stiles (1996). Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent General Secretory Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4095-4099.
- McKay, A. M. (1990). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11: 15-17.
- McMullen, L. M. y M. E. Stiles (1996). Potencial for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, suppl. 64-71.
- Mimmack, M. L., M. P. Gallagher, S. R. Pearce, S. C. Hyde, I. R. Booth y C. F. Higgins (1989). Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 8257-8261.
- Molin, G., B. Jeppsson, M. L. Johansson, S. Ahrne, S. Nobaek, M. Stahl y S. Bengmark (1993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 314-323.
- Monfort, J. M. (1994). Los bioconservadores como futura alternativa en la industria cárnica.

Cárnica 2000, pp., 41-46.

Moran, C. P., N. Lang, S. F. G. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero y R. Losick (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 186: 339-346.

Moreira, W. L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Morgan, S., R. P. Ross y C. Hill (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2995-3001.

Mortvedt, C. I. e I. F. Nes (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1601-1607.

Mortvedt, C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten e I. F. Nes (1991). Purification and amino sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1829-1834.

Mortvedt-Abildgaard, C. I., J. Nissen-Meyer, B. Jelle, B. Grenov, M. Skaugen e I. F. Nes (1995). Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 175-179.

Motlagh, A. M., A. K. Bhunia, F. Szostek, T. R. Hansen, M. C. Johnson y B. Ray (1992). Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 45-48.

Motlagh, A., M. Bukhtiyarova y B. Ray (1994). Complete nucleotide sequences of pSMB74, a plasmid encoding production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 305-312.

Mulders, J. W. M., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen y W. M. De Vos (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201: 581-584.

Mulis, K. B y A. F. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 55: 335-350.

Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer (1987). Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 553-560.

Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer (1991a). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ.*

Microbiol., 57: 114-121.

Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer (1991b). Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* sp. *J. Bacteriol.*, 173: 1779-1788.

Muriana, M. P. y J. B. Luchansky (1993). Biochemical methods for purification of bacteriocins. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 41-61. Hoover, D. G. y L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., Londres.

Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J Food Prot.*, suppl. 54-63.

Mundt, J. O. (1986). Enterococci. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1063-1065. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

Nes, I. F., L. S. Havarstein y H. Holo (1995). Genetics of non-lantibiotics. En: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*, pp. 645-651. Ferreti, J. J., M. S. Gilmore, T. R. Klaenhammer y F. Brown (eds.). Karger, Nueva York.

Nes, I. F. y J. R. Tagg (1996). Novel lantibiotics and their prepeptides. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 69: 89-97.

Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein y M. B. Brurberg (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.

Nettles, C. G. y S. F. Barefoot (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56: 338-356.

Nieto-Lozano, J. C., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, C. Peláez e I. F. Nes (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1-6.

Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo (1998). (Manuscrito enviado).

Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten e I. F. Nes (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174: 5686-5692.

Nissen-Meyer, J., A. G. Larsen, K. Sletten, M. Daeschel e I. F. Nes (1993a). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1973-1978.

Nissen-Meyer, J., L. S. Havarstein, H. Holo, K. Sletten e I. F. Nes (1993b). Association of

- lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1503-1509.
- Niven, C. F. y J. M. Sherman (1944). Nutrition of the enterococci. *J. Bacteriol.*, 47: 335-342.
- Noerlis, Y. y B. Ray (1994). Factors influencing immunity and resistance of *Pediococcus acidilactici* to the bacteriocin, pediocin AcH. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 138-143.
- Ohtsuka, E., S. Matsuki, M. Ikehara, Y. Takahashi y K. Matsubara (1985). An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2611.
- Ojcius, D. M. y J. D. Young (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?. *Trends Biochem. Sci.*, 16: 225-229.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, C. M. A. P. Franz y W. H. Holzapfel (1994). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from "wara"- a fermented skimmed cow milk product from West Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 438-441.
- Old, R. W. y S. B. Primrose (1987). Los plásmidos como vehículos de clonación para su uso en *E. coli*. En: Principios de Manipulación Genética. Introducción a la Ingeniería Genética, pp. 45-70. Ed. Acribia S. A., Zaragoza.
- Olson, E. R. (1993). Influence of the pH on bacterial gene expression. *Mol. Microbiol.*, 8: 5-14.
- Ordóñez, J. A., M. Fernández, O. Díaz, E. Hierro, G. D. García de Fernando y L. de la Hoz (1995). Papel de los microorganismos en la maduración de los embutidos crudos-curados. *AICE*, 48: 9-13.
- Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. Anhr. Fred. Host and Son., Copenague.
- O'Sullivan, M. G., G. Thornton, G. C. O'Sullivan y J. K. Collins (1992). Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends Food Sci. Technol.*, 3: 309-314.
- O'Sullivan, D. y T. R. Kaenhammer (1993). Rapid mini-pre isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2730-2733.
- Papon, M., R. Talon y M. C. Montel (1990). Les flores lipolytiques des viandes et produits carnés. *Viandes et Produits Carnés*, 11: 49-55.
- Parente, E., F. Villani, R. Copola y S. Copola (1989). A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait*, 69: 271-279.
- Parente, E. y C. Hill (1992a). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 290-298.

- Parente, E. y C. Hill (1992b). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 55: 497-502.
- Parente, E. y C. Hill (1992c). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.*, 55: 503-508.
- Parente, E. y A. Ricciardi (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 12-15.
- Parente, E., A. Ricciardi y G. Addario (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 388-394.
- Parsegian, V. A. y B. W. Ninham (1970). Temperature-dependent van der Waals forces. *Biophys. J.*, 10: 664-674.
- Pedrosa, M. C., B. B. Golner, B. R. Goldin, S. Barakat, G. Dallal y R. Russel (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutrition*, 61: 353-358.
- Perlman, D y H. O. Halvorson (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eucaryotic and procaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.*, 167: 391-409.
- Pestova, E. V., L. S. Havarstein y D. A. Morrison (1996). Regulation of transformability by an auto-induced peptide pheromone and a two component regulatory system. *Mol. Microbiol.*, 21: 855-864.
- Piard, J. C., F. Delorme, G. Giraffa, J. Commissaire y M. Desmazeaud (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ481. *Neth. Milk Dairy J.*, 44: 143-158.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud (1991). Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.
- Piard, J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud y T. R. Klaenhammer (1992). Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 279-284.
- Piard, J. C., O. P. Kuipers, H. S. Rollema, M. J. Desmazeaud y W. M. De Vos (1993). Structure, organization and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 358: 308-311.

- Piard, J. C. (1994). Lacticin 481, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 251-268. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme. (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- Pilet, M. F., X. Dousset, R. Barre, G. Novel, M. Desmazeaud y J. C. Piard (1995). Evidence of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 58: 256-262.
- Piva, A. y D. R. Headon (1994). Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology*, 140: 697-702.
- Platt, B. S. (1964). Biological ennoblement: improvement of the nutritive value of foods and dietary regimens by biological agencies. *Food Technol.*, 18: 68-76.
- Platt, T. (1986). Transcription termination and regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 1822-1828.
- Pompei, R., G. Lampis, F. Berlutti y M. C. Thaller (1991). Characterization of yellow pigmented enterococci from severe human infections. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2884-2886.
- Pompei, R., M. C. Thaller, F. Pittaluga, O. Flore y G. Satta (1992a). Analysis of bacteriolytic activity patterns, a novel approach to the taxonomi of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 37-43.
- Pompei, R., F. Berlutti, M. C. Thaller, A. Ingianni, G. Cortis y B. Dainelli (1992b). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 365-369.
- Porath, J., L. Sundberg, N. Fornstedt e I. Olson (1973). Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature*, 245: 465-466.
- Pot, B., W. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters y K-H. Schleifer (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hibridisations. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 513-517.
- Pot, B., P. Vandamme y K. Kersters (1994a). Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. En: Chemical Methods in Prokariotic Systematics, pp. 493-521. Goodfellow, M. y A. G. O'Donnell (eds.). J. Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters y K. H. Schleifer. (1994b). Taxonomy of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 49-67. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.

- Prentice, G. A. y P. Neaves (1986). The role of microorganisms in the dairy industry. *J. Appl. Bacteriol. Symp.*, suppl. 43S-57S.
- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *J. Mol. Biol.*, 99: 419-443.
- Pruitt, K. M. y B. Reiter (1985). Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. En: *The Lactoperoxidase System*, p. 143. Pruitt, K. M. y J. O. Tenovuo (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Przybylski, K. S. y L. D. Witter (1979). Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 261-264.
- Ptashne, M. (1992). *The genetic switch*. Cell Press & Blackwell Scientific Publications.
- Pucci, M. J., R. E. R. Vedamuthu, B. S. Kunka y P. A. Vandenberg (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2349-2353.
- Pugsley, A. P. (1984a) The ins and outs of colicins. Part I: production and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.*, 1: 168-175.
- Pugsley, A. P. (1984b). The ins and outs of colicins II. Lethal action, immunity, and ecological implications. *Microbiol. Sci.*, 1: 203-205.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete General Secretory Pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57: 50-108.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.*, 269: 12204-12211.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terebiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1995a). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.*, 177: 1144-1151.
- Quadri, L. E. N., K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1995b). Characterization of four genes involved in the production of antimicrobial peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17B. Published DNA sequence with accession nr. 147121. EMBLNEW.
- Quadri, L. E. N., L. Z. Yan, M. E. Stiles y J. C. Vederas (1997a). Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2: overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272: 3384-3388.

- Quadri, L. E. N., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. De Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1997b). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 179: 6113-6171.
- Ra, S. R., M. Qiao, T. Immonen, I. Pujana y P. E. J. Saris (1996). Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, 142: 1281-1288.
- Rammelsberg, M. y F. Radler (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 177-184.
- Rammelsberg, M., E. Muller y F. Radler (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.*, 154: 249-252.
- Rauch, P. J. C., M. M. Beerthuyzen y W. M. De Vos (1990). Nucleotide sequence of IS904 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain NIZOR5. *Nucl. Acids Res.*, 18: 4253-4254.
- Rauch, P. J. G. y W. M. De Vos (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 174: 1280-1287.
- Rauch, P. J. G., M. M. Beerthuyzen y W. V. De Vos (1994). Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1798-1804.
- Rauch, P. J. G. y W. M. De Vos (1994). Identification and characterization of the genes involved in excision of the *Lactococcus lactis* conjugative transposon Tn5276. *J. Bacteriol.*, 176: 2165-2171.
- Ray, B. (1992). The need for food biopreservation. En: Food Biopreservatives of Microbial Origin, pp.1-23. Ray, B. y M. Daeschel (eds.). CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- Ray, B. y D. G. Hoover (1993). Pediocins. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, pp. 181-210. Hoover, D. G. y L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Regassa, L. B. y M. J. Betley (1992). Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 174: 5095-5100.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre (1984). Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiol.*, 28: 237-241.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre (1995). Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 349-358.

- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *J. Food Microbiol.*, 46: 32-40.
- Revol-Junelles, A. M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour y G. Lefebvre (1996). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 120-124.
- Reyn, A. (1986). Genus *Gemella*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1081. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Rince, A., A. Dofour, S. L. E. Pogam, D. Thuault, C. M. Bourgois y J. P. Le Pennec (1994). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1652-1657.
- Ritchey, T. W. y H. W. Seeley (1976). Distribution of cytochrome-like respiration in streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, 93: 195-203.
- Rodrigues, U. y M. D. Collins (1990). Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.*, 71: 231-234.
- Rodríguez, J. M. (1991). Aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas de origen cárnico antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H. M. Dodd, P. E. Hernández and M. J. Gasson (1995a). Isolation of nisin-producing *Lactococcus* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 109- 115.
- Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, A. Suárez and P. E. Hernández (1995b). PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2802-2805.
- Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, M. I. Martínez, A. Suárez and P. E. Hernández (1997a). Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiol.*, 14: 363-371.
- Rodríguez, J. M., M. I. Martínez, A. M. Suárez, J. M. Martínez y P. E. Hernández (1997b). Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25: 73-74.
- Rogers, L. A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, 16: 321-325.
- Rosenberg, M. y D. Court (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and

termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.*, 13: 319-353.

Ross, K. F., C. W. Ronson y J. R. Tagg (1993). Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1652-1657.

Rubin, H. E. y F. Vaughan (1979). Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Sci.*, 62: 1873-1879.

Ruhr, E. y H. G. Sahl (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27: 841-845.

Ruiz-Barba, J. L., D. P. Cathcar, P. J. Warner y R. Jiménez-Díaz (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2059-2064.

Ryser, E. T., S. Masnier-Patin, J. Gratadoux y J. Richard (1994). Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, 21: 237-246.

Sabine, D. B. (1963). An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature*, 199: 811.

Sahl, H. G. (1991). Pore-formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. En: Nisin and Novel Lantibiotics, pp. 347-358. Jung, G. y H-G. Sahl (eds.). ESCOM Publishers, Leiden, Países Bajos.

Sahl, H. G., R. W. Jack y G. Bierbaum (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230: 827-853.

Sajber, C., R. Karakas y P. Mitic (1971). Influences of some starter cultures upon the changes in proteins of "satjer" sausages during fermentation. *Proc. 17th. Meet. Eur. Meat. Res. Work.* Bristol, Inglaterra.

Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 70: 347-358.

Salmond, G. P. C. y P. J. Reeves (1993). Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, 18: 7-12.

Salzano, G., F. Villani, O. Pepe, E. Sorrentino, G. Moschetti y S. Coppola (1992). Conjugal transfer of plasmid-borne bacteriocin production in *Enterococcus faecalis* 226NWC. *FEMS Microbiol. Lett.*, 99: 1-6.

Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Samelis, J., F. Maurogenakis y J. Metaxopoulus (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Food Microbiol.*, 23: 179-196.

Sanger F., S. Nicklen y A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 5463-5467.

Saucier, L., A. Poon y M. E. Stiles (1995). Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 684-690.

Saucier, L., A. S. Paradkar, L. S. Frost, S. E. Jensen y M. E. Stiles (1997). Transcriptional analysis and regulation of carnobacteriocin production in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Gene*, 188: 271-277.

Schatz, P. J. y J. Beckwith (1990). Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 215-248.

Schillinger, U. y F. K. Lücke (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.*, 4: 199-208.

Schillinger, U. y F. K. Lücke (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1901-1906.

Schillinger, U. y W. Holzapfel (1990). Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol.*, 7: 305-310.

Schillinger, U., W. Holzapfel y O. Kandler (1989). Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.*, 12: 48-55.

Schillinger, U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: *Biotechnology and Food Safety*, pp. 55-74. Bills, D. D. y S. Kung (eds.). Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachussets.

Schleifer, K. H. y R. Kilpper-Bälz (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *S. faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 31-34.

Schleifer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M. D. Collins y W. Fischer (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 183-195.

Schleifer, K. H. y R. Kilpper-Bälz (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 1-19.

Schnell, N., K. D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zahner, R. Kellner y G. Jung (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. *Nature*, 333: 276-278.

Schved, F., A. Salazar, Y. Henis y B. J. Juven (1993). Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 67-77.

Sharpe, M. E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. En: Identification Methods for Microbiologists, 2nd ed., Soc. Appl. Bacteriol. Techn. Series, no. 14, pp. 233-259. Skinner, L. y D. W. Lovelock (eds.). Academic Press, Londres.

Sherman, J. M. (1937). The *Streptococci*. *Bacteriol. Rev.*, 1: 3-97.

Shine, J. y L. Dalgarno (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71: 1342-1346.

Siegers, K. y K. D. Entian (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1082-1089.

Simpson, W. J. y J. R. Tagg (1986). M-type group A *Streptococcus* bacteriocin. *Can. J. Microbiol.*, 29: 1445-1451.

Siragusa, G. R. (1992). Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3508-3513.

Skaugen, M (1994). Lactocin S: structure determination and genetic analysis. Tesis Doctoral. Universidad Agrícola de Noruega, Aas, Noruega.

Skaugen, M., C. I. M. Abildgaard e I. F. Nes (1997). Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Mol. Gen. Genet.*, 253: 674-686.

Sletten, K. y G. Husby (1974). The complete amino-acid sequence of non-immunoglobulin amyloid proteins AS in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Biochem.*, 41: 117-125.

Smith J. L. y S. A. Palumbo (1981). Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.*, 44: 936-955.

Smith, J. L. y S. A. Palumbo (1983). Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.*, 46: 997-1006.

Sneath, P. H. A. y R. R. Sokal (1973). Numerical taxonomy. En: The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman, W. H. (ed.). San Francisco, California.

- Sobrino, O. J., J. M. Rodríguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernández, B. Sanz y P. E. Hernández (1992). Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 215-225.
- Sobrino, O. J. (1993). Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Latobacillus sake* 148. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Speck, M. L. (1981). Use of microbial cultures: dairy products. *Food Technol.*, 35: 71-73.
- Srinivasan, R. y E. Ruckenstein (1980). Role of physical forces in hydrophobic interaction chromatography. *Separation and Purification Methods*, 9: 267-370.
- Stackebrandt, E. y M. Teuber (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70: 1025-1030.
- Stahl, M., G. Molin, A. Persson, S. Ahmé y S. Stahl (1990). Restriction endonuclease patterns and multivariate analysis as a classification tool for *Lactobacillus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 189-193.
- Starrenburg, M. J. C. y J. Hugenholtz (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3535-3540.
- Steen, M. T., Y. J. Chung y J. N. Hansen (1991). Characterization of the nisin gene as a part of the polycistronic operon in chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC11454. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1181-1188.
- Stevens, K. A., B. W. Sheldom, N. A. Klapes y T. R. Klaemhammer (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3613-3615.
- Stiles, M. E. y J. W. Hastings (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 2: 247-251.
- Stiles, M. E. (1994). Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications, pp. 497-506. De Vuyst, L. y Vandamme, E. J. (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 70: 331-345.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
- Stoddard, G., J. P. Petzel, M. J. Van Belkum, J. Kok y L. L. McKay (1992). Molecular

- analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1952-1961.
- Stoffels, G., I. F. Nes y A. Guomundsdóttir (1992a). Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 309-316.
- Stoffels, G., J. Nissen-Meyer, A. Guomundsdóttir, K. Sletten, H. Holo e I. F. Nes (1992b). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1417-1422.
- Sudirman, I., F. Mathieu, V. Benoit y G. Lefebvre (1994). Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconostoc* strains. *Current Microbiol.*, 28: 155-159.
- Tagg, J. R. y A. R. McGiven (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21: 943.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani y L. W. Wannamaker (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tagg, J. R. y L. W. Wannamaker (1978). Streptococcin A-FF22: nisin like antibiotic substance produced by a group A *Streptococcus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14: 31-39.
- Tahara, T., M. Oshimura, C. Umezawa y K. Kanati (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 892-897.
- Tahara, T., y K. Kanatani (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1229. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 669-677.
- Talarico, T. L., I. A. Casas, T. C. Chung y W. J. Dobrogosz (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 674-679.
- Talarico, T. L. y W. J. Dobrogosz (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 674-679.
- Talarico, T. L., L. T. Axelsson, J. Novotny, M. Fruizat y W. J. Dobrogosz (1990). Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*. Purification of 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 943-948.
- Tamine, Y. A. (1990). Microbiology of starter cultures. En: *The Microbiology of Milk Products*, pp. 131-201. Robinson, R. K. (ed.). Elsevier Applied Science, Londres.
- Tannock, E. W. (1992). Conjugal manipulation of gut microorganisms. En: *Probiotics, The Scientific Basis*, pp., 181-207. Fuller, R (ed.). Chapman y Hall, Londres.

- Teixeira, L. M., V. L. C. Merquior, M. C. E. Vianni, M. G. S. Carvalho, S. E. L. Fracalanza, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner y R. R. Facklam (1996). Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garviae* isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garviae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 664-668.
- Ten Brink, B., M. Minekus, J. M. B. M. Van Der Vossen, R. J. Leery y J. H. J. Huis in't Veld (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 140-148.
- Teuber, M., A. Geis y H. Neve (1992). The genus *Lactococcus*. En: The Prokaryotes. A Hand Book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, vol. 2, pp. 1482-1501. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer (eds.). Springer-Verlag, Nueva York.
- Thiercelin, E. y L. Jouhaud (1903). Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie Paris*, 55: 686-688.
- Thomas, E. L. (1985). Bacterial hydrogen peroxide production. En: The Lactoperoxidase System, pp. 179-202. K. M. Pruitt y J. Tenovuo (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel y W. P. Hammes (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 460-468.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes (1993). Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch. Microbiol.*, 160: 279-283.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes (1994). Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology*, 140: 361-367.
- Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto y Y. Ike (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.*, 178: 3585-3593.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati y G. Giraffa (1994). Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.*, 11: 243-252.
- Upreti, G. C. y R. D. Hinsdill (1973). Isolation and characterization of a bacteriocin from a

homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 139-145.

Upreti, G. C. y R. D. Hinsdill (1975). Production and mode of action of lactocin 27: a bacteriocin from homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 145-149.

Upreti, G. C. (1994). Lactocin 27, a bacteriocin produced by homofermentative *Lactobacillus helveticus* strain LP27. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications*, pp. 331-35. De Vuyst, L. y Vandamme, E. J. (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.

Van Belkum, M. J., B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok y G. Venema (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1187-1191.

Van Belkum, M. J., B. J. Hayema, R. E. Jeeninga, J. Kok y G. Venema (1991a). Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 492-498.

Van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings y T. Abee (1991b). The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 173: 7934-7941.

Van Belkum, M. J., J. Kok y G. Venema (1992). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 572-577.

Van Belkum, M. J. y M. E. Stiles (1995). Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3573-3579.

Van Belkum, M. J., R. W. Worobo y M. E. Stiles (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 23: 1293-1301.

Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swings (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60: 407-438.

Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 221-238.

Vandenesch, F., S. J. Projan, B. Kreiswirth, J. Etienne y R. Novick (1993). *Agr*-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 111: 115-122.

Van der Meer, J. R., J. Polman, M. M. Berrthuyzen, R. J. Siezen, O. P. Kuipers y W. De Vos

- (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175: 2578-2588.
- Van der Vossen, J. M. B. M., D. Van Der Lelie y G. Venema (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2452-2457.
- Van der Vossen, J. M. B. M., M. H. M. Van Herwijnen, R. J. Leer, B. Ten Brink, P. H. Pouwels y J. H. J. Huis in't Veld (1994). Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by *in vivo* plasmid integration, and gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.*, 116: 333-340.
- Van Laack, R. L. J. M., U. Schillinger y W. H. Holzapfel (1992). Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 183-195.
- Vaughan, E. E., E. Caplice, R. Looney, N. O'Rourke, H. Coveney, C. Daly y G. F. Fitzgerald (1994). Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 118-123.
- Vauterin, L. y P. Vauterin (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.*, 1: 37-41.
- Venema, K., T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, J. Kok, W. N. Konings y G. Venema (1993). Mode of action of lactococcin B: a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1041-1048.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. D. Leij, G. Venema y J. Kok (1994). Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.*, 14: 521-532.
- Venema, K. (1995). Bacteriocins from lactic acid bacteria: lactococcins from *Lactococcus lactis* and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Venema, K., J. Kok, J. D. Marugg, M. Y. Toonen, A. M. Ledeboer, G. Venema y M. L. Chikindas (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.*, 17: 515-522.
- Venema, K., M. H. R. Dost, G. Venema y J. Kok (1996a). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 142: 2825-2830.

- Venema, K., M. H. R. Dost, P. A. H. Beun, A. J. Haandrikman, G. Venema y J. Kok (1996b). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1689-1692.
- Venema, K., M. L. Chikindas, J. F. M. L. Seegers, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, G. Venema y J. Kok (1997). Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 305-309.
- Vieira, J. y J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19: 259-265.
- Vignolo, G. M., F. Suriani, A. Ruiz Holgado y G. Oliver (1993). Antibacterial activity of *Latobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 344-349.
- Vila Aguilar, R. (1994). Procesos microbiológicos en la maduración de los embutidos crudos curados. *AICE*, 47: 14-15.
- Villani, F., G. Salazano, E. Sorrentino, O. Pepe, P. Marino y S. Coppola (1993). Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 380-387.
- Villani, F., O. Pepe, G. Mauriello, G. Salzano, G. Moschetti y S. Coppola (1995). Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 25: 179-190.
- Vlaemynck, G., L. Herman y K. Coudijzer (1994). Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 211-225.
- Vogel, H., L. Nillson, R. Rigler, S. Meder, G. Boheim, W. Beck, H. H. Kurth y G. Jung (1993). Structural fluctuations between two conformational states of a transmembrane helical peptide are related to its channel forming properties in planar lipid membranes. *Eur. J. Biochem.*, 212: 305-312.
- Von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequences cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, 133: 17-21.
- Von Heijne, G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.*, 177: 243-251.
- Von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.*, 192: 287-290.
- Von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analyses and the

positive-inside rule. *J. Mol. Biol.*, 225: 487-494.

Wagner, W., M. Vogel y W. Goebel (1983). Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J. Bacteriol.*, 154: 200-210.

Wagner, M. K. y L. J. Moberg (1989). Present and future of traditional antimicrobials. *Food Technol.*, 1: 143-147.

Wallbanks, S., A. J. Martínez-Murcia, J. L. Fryer, B. A. Phillips y M. D. Collins (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 224-230.

Wandersman, C. (1992). Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.*, 8: 317-322.

Weiss, N. (1992). The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. En: The Prokaryotes. A Hand Book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, vol. 2, pp. 1502-1507. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer (eds.). Springer-Verlag, Nueva York.

Whitehead, H. R. (1933). A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.*, 27: 1793-1800.

Williams, A. M., J. A. E. Farrow y M. D. Collins (1989). Reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 185-189.

Williams, A. M., J. L. Fryer y M. D. Collins (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 109-114.

Williams, A. M., U. M. Rodrigues y M. D. Collins (1991). Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res. Microbiol.*, 142: 67-74.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Res.*, 51: 221-271.

Wong, H. C. y Y. L. Chen (1988). Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2179-2184.

Worobo, R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1994). Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140: 517-526.

Worobo, R. W., M. J. Van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J.*

Bacteriol., 177: 3143-3149.

Yang, D. y C. R. Woese (1989). Phylogenetic structure of the "Leuconostocs": An interesting case of a rapidly evolving organism. *Syst. Appl. Microbiol.*, 12: 145-149.

Yang, R., M. C. Jonhson y B. Kay (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3355-3359.

Zitzelberger, W., F. Götz y K. H. Schleifer (1984). Distribution of superoxide dismutases, oxidases and NADH peroxidase in various streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, 21: 243-246.